

Universidad Pública de Navarra

Nafarroako Unibertsitate Publikoa

**ESCUELA TÉCNICA SUPERIOR
DE INGENIEROS AGRÓNOMOS**

*NEKAZARITZAKO INGENIARIEN
GOI MAILAKO ESKOLA TEKNIKOA*

Metabolismo del tejido graso de terneros de raza Pirenaica durante su crecimiento y cebo

presentado por

JACOBO ENRIQUE MARTÍNEZ SOLOZÁBAL

aurkeztua



**INGENIERO AGRÓNOMO
NEKAZARITZA INGENIARITZA**

Julio, 2013 / *Uztaila, 2013*

Metabolismo del tejido graso de terneros de raza Pirenaica durante su crecimiento y cebo



Escuela Técnica Superior de
Ingenieros Agrónomos

*Nafarroako
Unibertsitate
Publikoa*



Universidad
Pública de
Navarra

Beatriz Soret Lafraya y José Antonio Mendizábal Aizpuru, Profesores Titulares del Área de Producción Animal de la Escuela Técnica Superior de Ingenieros Agrónomos de la Universidad Pública de Navarra.

INFORMAN: que el Trabajo Fin de Carrera titulado “Metabolismo del tejido graso de terneros de raza Pirenaica durante su crecimiento y cebo” que presenta el alumno Jacobo Enrique Martínez Solozábal, ha sido realizado en el Departamento de Producción Agraria bajo nuestra dirección, cumple las condiciones exigidas y autorizamos su presentación.

Y para que así conste, firmamos el presente informe en Pamplona a 3 de julio de 2013.

Fdo.: Beatriz Soret Lafraya

Fdo.: José Antonio Mendizábal Aizpuru

AGRADECIMIENTOS

A Beatriz Soret y José Antonio Mendizábal, directores de este Trabajo Fin de Carrera, por la ayuda prestada durante todo este tiempo, que ha sido mucha.

A Juan, por sus consejos sobre el manejo de las muestras y la medición de la actividad enzimática.

A Isabel, Cristina y Olaia, porque siempre han estado dispuestas a ayudarme a resolver los pequeños y grandes problemas que me han ido surgiendo en el laboratorio.

A María, Daniel y Dersu, por su inestimable ayuda y colaboración durante los dos últimos años de carrera.

Finalmente, a mis padres y mis hermanos, así como a mis tíos y primos, que siempre me han apoyado y sin los cuales hubiera sido imposible llegar hasta aquí.

También merecen figurar en esta lista otras personas e instituciones sin los que este trabajo no hubiera podido llevarse a cabo:

El Ministerio de Economía y Competitividad por la financiación del proyecto titulado *Identificación de factores y mecanismos moleculares implicados en el desarrollo de la grasa intramuscular o de veteados en vacuno de carne (AGL 2008-00492)*.

Francisco Javier Aranguren (Director Técnico de ASPINA) por la selección de los terneros y los controles efectuados.

José Ignacio Pérez de Albéniz (Piensos San Cristóbal) por el asesoramiento y elaboración de los piensos.

Jesús M^a Zabaleta (ganadero) por proporcionar los terneros y las instalaciones.

Desde aquí nuestro agradecimiento.

ÍNDICE

ABREVIATURAS	I
ÍNDICE DE TABLAS.....	III
ÍNDICE DE FIGURAS.....	IV
RESUMEN.....	VII
1. INTRODUCCIÓN	2
2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	5
2.1. TEJIDO ADIPOSEO	5
2.1.1. TIPOS DE TEJIDO ADIPOSEO	5
2.1.1.1. Tejido adiposo blanco	6
2.1.1.2. Tejido adiposo pardo	8
2.1.2. DESARROLLO DEL TEJIDO ADIPOSEO	10
2.1.2.1. Origen.....	10
2.1.2.2. Crecimiento.....	11
2.1.2.3. Alometría	12
2.1.3. ALMACENAMIENTO ENERGÉTICO EN EL TEJIDO GRASO	14
2.1.3.1. Ácidos grasos.....	14
2.1.3.2. Glicerol-3-fosfato.....	15
2.1.3.3. Triglicéridos.....	16
2.1.4. LIPOGÉNESIS	17
2.1.4.1. Síntesis de glicerol-3-fosfato.....	18
2.1.4.2. Síntesis <i>de novo</i> de ácidos grasos.....	19
2.1.4.3. Síntesis de triglicéridos.....	22

2.2. DIGESTIÓN Y METABOLISMO DE LOS LÍPIDOS EN LOS RUMIANTES	23
2.2.1. APARATO DIGESTIVO DE LOS RUMIANTES	23
2.2.1.1. El rumen o panza	24
2.2.1.2. El retículo o redécilla.....	24
2.2.1.3. El omaso o librilla	25
2.2.1.4. El abomaso o cuajar	25
2.2.2. DIGESTIÓN DE LOS LÍPIDOS.....	25
2.2.2.1. Hidrólisis	27
2.2.2.2. Biohidrogenación.....	28
2.2.2.3. Absorción en el intestino.....	29
2.2.3. ÁCIDOS GRASOS VOLÁTILES	30
2.2.3.1. Producción de ácidos grasos volátiles.....	30
2.2.3.2. Absorción de ácidos grasos volátiles	32
2.2.3.3. Función de los ácidos grasos volátiles	33
2.3. RAZA PIRENAICA	34
2.3.1. RESEÑA HISTÓRICA	34
2.3.2. SITUACIÓN ACTUAL.....	35
2.3.3. CARACTERÍSTICAS DE LA RAZA	37
3. OBJETIVOS Y PLANTEAMIENTO EXPERIMENTAL.....	40
4. MATERIAL Y MÉTODOS.....	43
4.1. MATERIAL ANIMAL Y DIETAS	43
4.1.1. ESTABLECIMIENTO DE LOTES	43
4.1.2. DIETAS.....	44
4.1.2.1. Pienso con alta energía metabolizable	44
4.1.2.2. Pienso con baja energía metabolizable.....	45
4.1.3. CARACTERÍSTICAS PRODUCTIVAS	46
4.2. SACRIFICIO Y TOMA DE MUESTRAS.....	48

4.3. TAMAÑO Y NÚMERO DE LOS ADIPOCITOS.....	49
4.4. ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA	50
4.4.1. HOMOGENEIZACIÓN DE LAS MUESTRAS.....	50
4.4.2. MEDIDA DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA	53
4.4.2.1. Actividad de la enzima G3PDH.....	54
4.4.2.2. Actividad de la enzima FAS.....	55
4.4.2.3. Actividad de la enzima ICDH	56
4.4.2.4. Actividad de la enzima G6PDH.....	57
4.4.3. CÁLCULOS MATEMÁTICOS.....	58
4.5. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	60
5. RESULTADOS	63
4.6. GLICEROL 3 FOSFATO DESHIDROGENASA	63
4.7. SINTETASA DE ÁCIDOS GRASOS.....	64
4.8. ISOCITRATO DESHIDROGENASA	65
4.9. GLUCOSA 6 FOSFATO DESHIDROGENASA	66
6. DISCUSIÓN	69
7. CONCLUSIONES.....	77
8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	79

ABREVIATURAS

ADP	Adenosín difosfato
AG	Ácido graso
AGV	Ácido graso volátil
AMP	Adenosín monofosfato
ARPIEL	Arabako Pirenaikoaren Elkartea (Asociación de Ganado Pirenaico de Álava)
ASAPI	Asociación Aragonesa de Ganaderos de Bovinos de Raza Pirenaica
ASGAPIR	Asociación de Ganado Pirenaico de Vizcaya
ASPIC	Associació de criadors de vacú de raça pirenaica de Catalunya (Asociación de criadores de vacuno de raza pirenaica de Cataluña)
ASPICAN	Asociación de Criadores de Ganado Vacuno Pirenaico de Cantabria
ASPINA	Asociación de Criadores de Ganado Vacuno Pirenaico de Navarra
ATP	Adenosín trifosfato
CoA	Coenzima A
CONASPI	Confederación de Asociaciones de Ganado Vacuno Pirenaico
D	Depósito graso
EE	Error estándar
ENL	Energía neta leche
EM	Energía metabolizable
FAS	Sintetasa de ácidos grasos
G3PDH	Glicerol 3 fosfato deshidrogenasa
G6PDH	Glucosa 6 fosfato deshidrogenasa
GMD	Ganancia media diaria
HEBE	Herri Behi Elkartea (Asociación de Ganado Pirenaico de Guipúzcoa)
ICDH	Isocitrato deshidrogenasa
IM	Intramuscular
IUPAC	International Union of Pure and Applied Chemistry

L	Lote
LPL	Lipoprotén lipasa
NAD⁺	Dinucleótido Adenín Dinucleótido (forma oxidada)
NADH	Dinucleótido Adenín Dinucleótido (forma reducida)
NADP⁺	Nicotinamida Adenina Dinucleótido fosfato (forma oxidada)
NADPH	Nicotinamida Adenina Dinucleótido fosfato (forma reducida)
P	Valor p (nivel de significación)
PB	Proteína bruta
PD	Proteína digestible
PDIE	Proteína digestible a nivel intestinal procedente de la energía
PDIN	Proteína digestible a nivel intestinal procedente del nitrógeno
PV	Peso vivo
R²	Coefficiente de determinación
SC	Subcutáneo
TAB	Tejido adiposo blanco
TAP	Tejido adiposo pardo
UFC	Unidades forrajeras carne
UFL	Unidades forrajeras leche
VLDL	Lipoproteínas de muy baja densidad

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Clasificación y componentes de los lípidos (adaptado de Ureña, 2013).....	26
Tabla 2. Composición en ácidos grasos de algunos alimentos (Palmquist, 1996).....	28
Tabla 3. Origen de los AGV (Hutjens, 2003).....	30
Tabla 4. Cambios sufridos por los AGV en el epitelio del rumen (adaptado de Mora, 1991)	33
Tabla 5. Censo de ganado Pirenaico	36
Tabla 6. Diseño de los cuatro lotes de terneros	43
Tabla 7. Ingredientes del pienso con alta energía metabolizable	45
Tabla 8. Análisis químico del pienso con alta energía metabolizable.....	45
Tabla 9. Ingredientes del pienso con baja energía metabolizable.....	45
Tabla 10. Análisis químico del pienso con baja energía metabolizable.....	46
Tabla 11. Evolución de los parámetros productivos de los terneros (Pascual, 2011)	46
Tabla 12. Evolución del crecimiento de los terneros entre los 12 y los 18 meses (Pascual, 2011)	47
Tabla 13. Diámetro medio (μm) de los adipocitos.....	50
Tabla 14. Homogenización de las muestras de grasa del depósito subcutáneo	52
Tabla 15. Homogenización de las muestras de grasa del depósito intramuscular.....	52
Tabla 16. Niveles de significación de los efectos lote (L), depósito grasa (D), lote x depósito (LxD) y el coeficiente de determinación (R^2), para la actividad de la enzima lipogénica glicerol 3 fosfato deshidrogenasa (G3PDH).....	63
Tabla 17. Niveles de significación de los efectos lote (L), depósito grasa (D), lote x depósito (LxD) y el coeficiente de determinación (R^2), para la actividad de la enzima lipogénica sintetasa de ácidos grasos (FAS).....	64
Tabla 18. Niveles de significación de los efectos lote (L), depósito grasa (D), lote x depósito (LxD) y el coeficiente de determinación (R^2), para la actividad de la enzima lipogénica isocitrato deshidrogenasa (ICDH).....	65
Tabla 19. Nivel de significación del efecto lote (L) y coeficiente de determinación (R^2), para la actividad de la enzima lipogénica glucosa 6 fosfato deshidrogenasa (G6PDH).....	66

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Estructura de un adipocito blanco (adaptado de Kühnel, 1997)	6
Figura 2. Estructura de un adipocito pardo (adaptado de Kühnel, 1997)	8
Figura 3. Formación de los adipocitos (adaptado de Becerril, 2011)	10
Figura 4. Esquema del proceso de hiperplasia (adaptado de Díaz, 2010)	11
Figura 5. Esquema del proceso de hipertrofia (adaptado de Díaz, 2010)	11
Figura 6. Orden de desarrollo de los tejidos (adaptado de Acero, 1994)	13
Figura 7. Orden de desarrollo de los depósitos grasos (Sainz y Hasting, 2000)	13
Figura 8. Tipos de ácidos grasos (adaptado de Sizer, Whitney y Piché, 2012)	14
Figura 9. Tipos de ácidos grasos insaturados.....	15
Figura 10. Estructura del glicerol y del glicerol-3-fosfato	16
Figura 11. Formación del triglicérido	16
Figura 12. Síntesis de triglicéridos en el adipocito (adaptado de Vernon, 1980)	17
Figura 13. Esquema de la síntesis de glicerol-3-fosfato (adaptado de Vernon, 1980)	18
Figura 14. Acción de la enzima glicerol 3 fosfato deshidrogenasa	18
Figura 15. Esquema de la síntesis <i>de novo</i> de ácidos grasos (adaptado de Vernon, 1980).....	19
Figura 16. Molécula de ácido palmítico	20
Figura 17. Formación de AG a partir del ácido palmítico (adaptado de Peña <i>et al.</i> , 2004).....	21
Figura 18. Formación del triglicérido	22
Figura 19. Partes del tubo digestivo de los rumiantes (adaptado de Addison Wesley Longman Inc, 1999).....	23
Figura 20. Digestión de los lípidos en los rumiantes (Martínez <i>et al.</i> , 2010b).....	26
Figura 21. Hidrólisis de los lípidos en el rumen (van Lier y Regueiro, 2008)	27
Figura 22. Estructura de las lipoproteínas (Gil, 2010).....	29
Figura 23. Influencia de la dieta sobre los AGV y la producción de leche (Wattiaux y Armentano, 2013)	31

Figura 24. Vías metabólicas de producción de acetato, butirato y propionato (van Lier y Regueiro, 2008)	32
Figura 25. Principales ácidos grasos volátiles	32
Figura 26. Evolución morfológica de la raza Pirenaica (Aranguren, 2002)	35
Figura 27. Logotipo de la IGP Ternera de Navarra (www.terneradenavarra.es)	36
Figura 28. Distribución del ganado de raza Pirenaica en España	37
Figura 29. Ejemplares macho (A) y hembra (B) de raza Pirenaica (www.conaspi.es)	38
Figura 30. Esquema de selección de los terneros (adaptado de Pascual, 2011)	40
Figura 31. Localización de Aibar en Navarra (adaptado de SITNA, 2013).....	43
Figura 32. Los terneros en la explotación de Aibar.....	44
Figura 33. Peso medio de los animales en el momento del sacrificio	47
Figura 34. Ganancia media diaria (kg/día) de cada lote	47
Figura 35. Canales y zona en la que se extrajeron las muestras.....	48
Figura 36. Imágenes al microscopio (x300) de adipocitos de los depósitos subcutáneo (A) e intramuscular (B).....	49
Figura 37. Espectrofotómetro empleado en las mediciones (Montes, 2012)	53
Figura 38. Esquema del funcionamiento de un espectrofotómetro de doble haz (Skoog, Holler y Crouch, 2008)	53
Figura 39. Valores medios de la actividad de la enzima glicerol 3 fosfato deshidrogenasa en los depósitos grasos subcutáneo e intramuscular de cada lote (Lote 1: sacrificio a los 6 meses; lote 2: sacrificio a los 12 meses; lote 3: sacrificio a los 18 meses + ración de alta energía; lote 4: sacrificio a los 18 meses + ración de baja energía).	64
Figura 40. Valores medios de la actividad de la enzima sintetasa de ácidos grasos en los depósitos grasos subcutáneo e intramuscular de cada lote (Lote 1: sacrificio a los 6 meses; lote 2: sacrificio a los 12 meses; lote 3: sacrificio a los 18 meses + ración de alta energía; lote 4: sacrificio a los 18 meses + ración de baja energía).	65
Figura 41. Valores medios de la actividad de la enzima isocitrato deshidrogenasa en los depósitos grasos subcutáneo e intramuscular de cada lote (Lote 1: sacrificio a los 6 meses; lote 2: sacrificio a los 12 meses; lote 3: sacrificio a los 18 meses + ración de alta energía; lote 4: sacrificio a los 18 meses + ración de baja energía).	66
Figura 42. Valores medios de la actividad de la enzima glucosa 6 fosfato deshidrogenasa en el depósito graso subcutáneo de cada lote (Lote 1: sacrificio a los 6 meses; lote 2: sacrificio a los	

12 meses; lote 3: sacrificio a los 18 meses + ración de alta energía; lote 4: sacrificio a los 18 meses + ración de baja energía)..... 67

RESUMEN

Título del Trabajo Fin de Carrera: Metabolismo del tejido graso de terneros de raza Pirenaica durante su crecimiento y cebo.

Directores: José Antonio Mendizábal Aizpuru y Beatriz Soret Lafraya

Resumen:

El presente Trabajo Fin de Carrera ha consistido en el estudio de un aspecto tan importante en el metabolismo del tejido adiposo como es la actividad de las enzimas lipogénicas. Estas enzimas presentan un papel fundamental en el desarrollo del mismo, pues intervienen tanto en la síntesis de ácidos grasos como en la de glicerol-3-fosfato, moléculas que tras una serie de reacciones de esterificación darán lugar a los triglicéridos.

Las enzimas estudiadas han sido la glicerol 3 fosfato deshidrogenasa (G3PDH), la sintetasa de ácidos grasos (FAS), la isocitrato deshidrogenasa (ICDH) y la glucosa 6 fosfato deshidrogenasa (G6PDH).

La enzima G3PDH interviene en la síntesis de glicerol-3-fosfato, mientras que la FAS está implicada en la producción de ácido palmítico. Por su parte, las otras dos enzimas (ICDH y G6PDH) actúan en procesos en los que se genera poder reductor, necesario para el desarrollo de las reacciones por las que se producen los citados glicerol-3-fosfato y ácido palmítico.

El objetivo del trabajo ha sido estudiar la influencia que la edad de los terneros, la concentración energética de la ración y el depósito graso tienen sobre los niveles de actividad de las cuatro enzimas citadas anteriormente. Para ello se dispuso de muestras de grasa de los depósitos subcutáneo e intramuscular de 16 terneros machos de raza Pirenaica agrupados en 4 lotes:

- Lote 1: terneros sacrificados a los 6 meses de edad y alimentados principalmente con leche materna.
- Lote 2: terneros sacrificados a los 12 meses de edad y alimentados con pienso convencional a partir de los seis meses.
- Lote 3: terneros sacrificados a los 18 meses de edad y alimentados con un pienso rico en energía a partir de los doce meses.
- Lote 4: terneros sacrificados a los 18 meses de edad y alimentados con un pienso de menor riqueza energética que el del L3 a partir de los doce meses.

Las muestras del depósito subcutáneo procedían de la región dorsal izquierda, cerca de la décima costilla, mientras que las del intramuscular se extrajeron del músculo *Longissimus dorsi*.

La medición de la actividad enzimática se hizo mediante espectrofotometría, utilizando para ello un espectrofotómetro de doble haz. El tratamiento estadístico de los datos obtenidos consistió en un análisis de varianza, estudiándose el efecto que la edad, la concentración energética de la ración y el tipo de depósito graso tenían sobre la actividad de las enzimas lipogénicas.

Los resultados obtenidos muestran que no hubo diferencias estadísticamente significativas debidas al efecto de la edad y de la concentración energética de los piensos para la actividad de ninguna de las cuatro enzimas lipogénicas estudiadas en el presente trabajo ($p > 0,05$). Sí se encontraron diferencias significativas entre depósitos grasos para las cuatro enzimas, de manera que en el depósito subcutáneo la actividad enzimática fue superior a la mostrada en el depósito intramuscular ($p < 0,05$). El diferente desarrollo que presentan los adipocitos del depósito SC y del IM, que se traduce en un mayor tamaño de los primeros, podría ser la causa de estas diferencias.

En definitiva, la actividad de las enzimas glicerol 3 fosfato deshidrogenasa (G3PDH), isocitrato deshidrogenasa (ICDH), glucosa 6 fosfato deshidrogenasa (G6PDH) y sintetasa de ácidos grasos (FAS) no se ha visto influida ni por la edad ni por la concentración energética de la dieta, pero sí por el depósito graso.

INTRODUCCIÓN

1. INTRODUCCIÓN

En 2012 el sector vacuno de carne español supuso el 15,3 % de la producción final ganadera y el 5,8 % de la producción final agraria de nuestro país; unas cifras sólo superadas, entre las producciones ganaderas, por los sectores porcino y lácteo (MAGRAMA, 2013). Con un censo cercano a los seis millones de cabezas, España ocupa el quinto puesto dentro de la Unión Europea en lo que respecta al número de animales, tras Francia, Alemania, Italia y Reino Unido. España también ocupa la quinta posición en la cantidad de carne de vacuno producida (unas 597.000 toneladas, datos ligeramente inferiores al 2011) aunque entre 2005 y 2012 la producción ha descendido casi un 18 % (MAGRAMA, 2013).

El consumo de carne de vacuno fresca en España ese mismo año se redujo un 3,3 % respecto a 2011, quedándose por debajo 15 kg por persona, una cantidad inferior a la de países de nuestro entorno (MAGRAMA, 2013). Como causas del descenso en el consumo experimentado en los últimos años cabe destacar la percepción por parte del consumidor de tratarse de un producto poco saludable (al que relaciona con problemas cardiovasculares); su precio, superior al de otras carnes como el cerdo o el pollo; e incluso la existencia de un cierto recelo debido a escándalos como el de las vacas locas (Martín, 2011). Sin ir más lejos, durante la primera mitad de 2013 la carne de ternera ha vuelto a la primera plana informativa como consecuencia de haberse detectado restos de carne de potro en alimentos preparados exclusivamente (o al menos eso era lo que constaba en la etiqueta) con vacuno.

La identificación de este tipo de carne con las enfermedades del corazón no carece de base científica. La composición de la grasa de los rumiantes es sensiblemente más desfavorable para la salud humana que la de otras carnes, ya que presenta una mayor proporción de ácidos grasos saturados (Silla, 2004). Con la intención de minimizar este problema, en la actualidad se están desarrollando proyectos que tienen como meta la obtención de animales con una composición lipídica de su carne más saludable mediante la inclusión en sus dietas de ciertos alimentos ricos en ácidos insaturados (semilla de lino, chía, etc.).

Además de intentar mejorar la composición de las grasas, los investigadores también trabajan en la consecución de animales con un desarrollo más equilibrado del tejido adiposo. El objetivo es obtener canales con niveles inferiores de grasa subcutánea, suficientes para protegerla de la deshidratación y las contaminaciones bacterianas (Cuthbertson y Kempster, 1979; cit. Velasco, 1998) y con una cantidad de grasa intramuscular que asegure que la carne posea las características organolépticas adecuadas (Hocquette *et al.*, 2010). Para conseguirlo es muy importante conocer lo mejor posible los mecanismos relacionados con el metabolismo del tejido adiposo y los

factores que pueden afectar al mismo, como la edad o el tipo de alimentación, aspectos estudiados en el presente Trabajo Fin de Carrera.

Este trabajo, incluido en el proyecto de investigación titulado *Identificación de factores y mecanismos moleculares implicados en el desarrollo de la grasa intramuscular o de vetado en vacuno de carne (AGL 2008-00492)* y desarrollado por el Área de Producción Animal de la UPNA, se centra en el estudio de las enzimas lipogénicas, es decir, aquellas relacionadas con el desarrollo y metabolismo del tejido adiposo.

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2.1. TEJIDO ADIPOSO

El tejido adiposo es un tipo de tejido conectivo caracterizado por la presencia mayoritaria de unas células denominadas adipocitos. Estas células tienen la capacidad de almacenar en forma de triglicéridos la energía sobrante, con el objeto de aprovecharla durante futuros periodos de escasez de alimentos (Ross y Pawlina, 2008). Pero los adipocitos no son el único componente del tejido graso; según Cinti (2007), estos representan más o menos el 50 % de las células presentes en el mismo, mientras que el resto son preadipocitos, fibroblastos, mastocitos, macrófagos, células mesenquimales y células nerviosas y del tejido circulatorio.

Que la energía se acumule en forma de triglicéridos se debe a la elevada eficiencia energética de estas moléculas respecto a otras como el glucógeno. Y es que, por cada gramo de triglicéridos que se degrada se obtienen 9 kcal, mientras que 1 gramo de hidratos de carbono únicamente proporciona 4 kcal. Además, la cantidad de agua requerida para poder ser almacenados es mucho menor en el caso de los lípidos (1 gramo de agua/gramo de triglicéridos, frente a los 4 gramos de agua/gramo de glucógeno o de proteínas) (Gil, 2010).

Hasta no hace mucho se consideraba al tejido graso como un tejido pasivo, un mero almacén de triglicéridos que debido a su propia naturaleza también servía de aislante o contribuía al sostén de determinados órganos. Esto es algo que han desmentido los estudios realizados en las últimas décadas, que han puesto de manifiesto que las células adiposas sintetizan y secretan una gran cantidad de sustancias de naturaleza endocrina.

Este apartado dedicado al tejido adiposo se centrará en estos y otros aspectos importantes relacionados con su desarrollo y metabolismo, prestando especial atención a aquellos procesos en los que intervengan las enzimas estudiadas en el presente Trabajo Fin de Carrera.

2.1.1. TIPOS DE TEJIDO ADIPOSO

En función de la coloración se distinguen dos tipos de tejido graso: el blanco y el pardo. El primero es el predominante en los animales adultos, mientras que el segundo cobra mayor importancia en neonatos, mamíferos inferiores y animales hibernantes (Moreno, Monereo y Álvarez, 2000).

Además de en la coloración, Moreno y Martínez (2002) señalan que estos dos tejidos también presentan características distintas en cuanto a su morfología, genes, control y distribución en el organismo.

A continuación se exponen brevemente los aspectos más destacados de cada uno de ellos.

2.1.1.1. Tejido adiposo blanco

A. Características

El tejido adiposo blanco (TAB) está formado mayoritariamente por adipocitos uniloculares (es decir, con sólo una vacuola de lípidos) siendo esta la razón de que también se le denomine tejido adiposo unilocular. Como su propio nombre indica, el TAB presenta un color blanquecino que puede ser más o menos amarillento en función de la alimentación. Por ejemplo, una dieta rica en carotenoides (pigmentos liposolubles presentes en hortalizas como las zanahorias) hará que la grasa adopte una tonalidad amarilla (Bennet *et al.*, 2005; cit. Pérez, 2010)

Esa única inclusión lipídica alcanza tales dimensiones que el núcleo y el resto de orgánulos celulares se ven desplazados hacia la periferia, tal y como puede apreciarse en la figura 1.

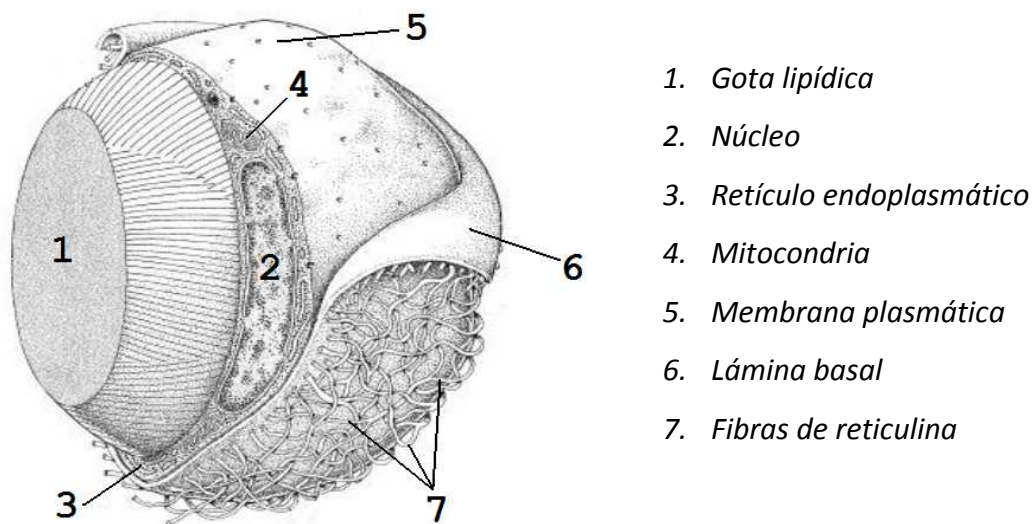


Figura 1. Estructura de un adipocito blanco (adaptado de Kühnel, 1997)

El núcleo, sin nucléolo visible, se ve constreñido entre la vacuola y la membrana plasmática, adoptando una forma ovalada. A su alrededor, unas pocas mitocondrias, un retículo endoplasmático escasamente desarrollado y un pequeño aparato de Golgi ocupan casi todo el resto del citoplasma (Valenzuela y Sanhueza, 2009).

Los adipocitos uniloculares son células grandes y esféricas, aunque se deforman adoptando formas geométricas en las zonas en las que se encuentran más juntas como consecuencia de la presión que ejercen unas sobre otras (Fawcett, 1995).

Cabe destacar la abundante presencia de vasos circulatorios distribuidos entre las células, necesarios para que se produzca el intercambio de metabolitos entre las células adiposas y el torrente sanguíneo. Valenzuela y Sanhueza (2009) señalan que muchos adipocitos están en contacto directo con uno o más capilares.

B. Funciones

• **Reservorio energético**

La principal función del tejido adiposo blanco es la de servir como almacén de la energía metabólica sobrante. Los adipocitos blancos o uniloculares acumulan esa energía en forma de triglicéridos hasta el momento en que es requerida por el organismo para satisfacer sus necesidades ante la falta de alimento.

El mecanismo de síntesis de triglicéridos se explica con detenimiento un poco más adelante, en el apartado dedicado a la lipogénesis.

• **Función endocrina**

Se conoce con el nombre de adipocitocinas a las numerosas proteínas, citocinas y hormonas que son sintetizadas por los adipocitos. La lista es extensísima, y a día de hoy todavía se siguen descubriendo nuevas sustancias producidas por estas células. Una de las más estudiadas es la leptina, hormona que permite al cerebro conocer la cantidad de grasa presente en el organismo para adecuar tanto la ingesta como el gasto de energía (Moreno y Martínez, 2002).

A continuación se señalan algunas de las moléculas sintetizadas por el tejido adiposo y su campo de actuación (Moreno y Martínez, 2002):

- Regulación del peso corporal: Leptina, Acrp30/adipoQ.
- Sistema inmune: TNF α , IL-1, IL-6.
- Sistema vascular: angiotensina, inhibidor del activador del plasminógeno tipo 1.
- Función reproductora: andrógenos y estrógenos.
- Resistencia a la insulina: resistina.

• **Función estructural**

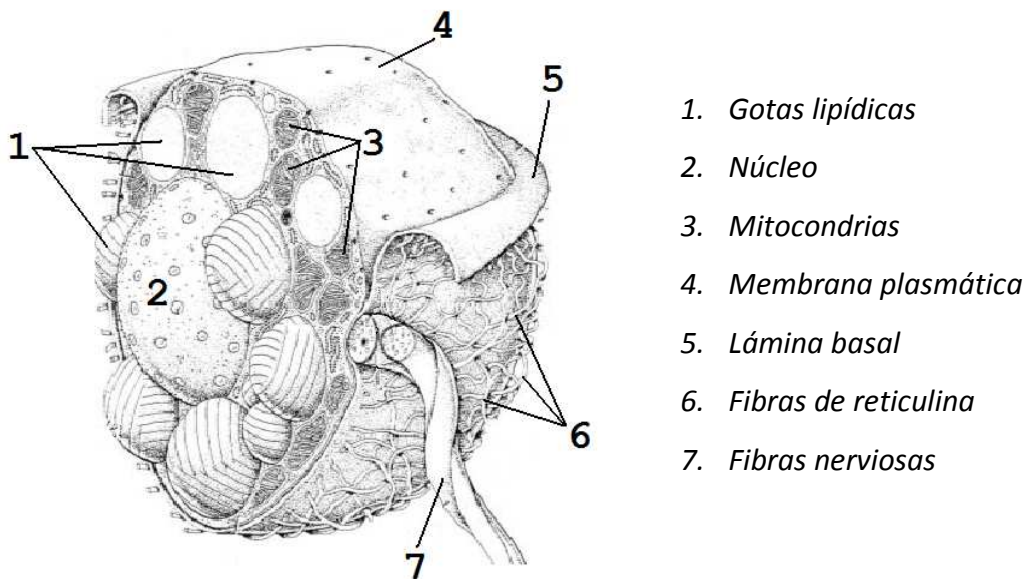
El tejido adiposo blanco también desempeña funciones de carácter estructural, sirviendo de sostén de diversos órganos y de amortiguador de golpes. Además, el depósito subcutáneo cumple una importante función como aislante térmico (Ross y Pawlina, 2008).

2.1.1.2. Tejido adiposo pardo

A. Características

En este caso, el tejido presenta células adiposas de menor tamaño pero con una gran cantidad de vacuolas de grasa y un elevado número de mitocondrias, mucho mayor que en los adipocitos uniloculares (Valenzuela y Sanhueza, 2009). La coloración pardo-rojiza viene determinada por la alta vascularización y por la gran concentración de citocromos (Hill, 1980).

En la figura 2 se señalan las partes más importantes de estas células.



1. Gotas lipídicas
2. Núcleo
3. Mitocondrias
4. Membrana plasmática
5. Lámina basal
6. Fibras de reticulina
7. Fibras nerviosas

Figura 2. Estructura de un adipocito pardo (adaptado de Kühnel, 1997)

A los adipocitos pardos también se los conoce como pluriloculares debido al alto número de gotitas lipídicas que contienen. A diferencia de los adipocitos blancos, en estas células el núcleo no se encuentra tan desplazado, sino que se sitúa en una posición un poco excéntrica, tiene forma esférica y presenta un nucléolo visible. Por su parte, las mitocondrias son redondeadas, grandes y presentan abundantes crestas dispuestas muy juntas. En cuanto al resto de organelos hay que señalar que tanto el retículo endoplasmático como el aparato de Golgi se encuentran escasamente desarrollados (Valenzuela y Sanhueza, 2009).

Estas células adiposas se agrupan formando lóbulos que, macroscópicamente, recuerdan a una glándula endocrina. En torno a ellas aparecen bastantes fibras nerviosas y una multitud de capilares sanguíneos, muchos más que en el tejido adiposo blanco (Valenzuela y Sanhueza, 2009).

B. Funciones

• *Termogénesis*

La función más importante desempeñada por el tejido adiposo pardo es la termogénesis facultativa. La termogénesis (es decir, la producción de calor) es el fenómeno que permite a los animales homeotermos mantener constante su temperatura corporal. No es un proceso único, sino que tiene varios componentes (Obregón, 2007):

- Termogénesis obligatoria, también conocida como metabolismo basal, es decir, el gasto de energía necesario para el mantenimiento de las funciones vitales del cuerpo (respiración celular, bombeo de iones, etc).
- Termogénesis asociada a la dieta: efecto térmico que acompaña a la digestión, absorción, distribución y almacenamiento de los nutrientes.
- Termogénesis asociada a la actividad física.
- Termogénesis facultativa o adaptativa. Surge como respuesta al frío o a una dieta hipercalórica. Es llevada a cabo por los músculos (mediante el tiritío) y, como ya se ha señalado, por los adipocitos pardos. Estas células tienen la capacidad de producir calor gracias a la proteína desacopladora UCP-1.

El tejido adiposo pardo se encuentra repartido por el organismo rodeando órganos como el corazón, los riñones y la arteria aorta, es decir, lugares en los que es capaz de calentar la sangre (Velasco, 1998; Obregón, 2007). Mediante la circulación sanguínea se redistribuye el calor por el resto del cuerpo, ya sea a la salida del periodo hibernante o justo tras el nacimiento (como ocurre en el caso de los terneros).

• *Otras funciones*

Por otro lado, y al igual que el tejido adiposo blanco, el plurilocular también desempeña otras funciones. Según Cinti (2007), este tejido sintetiza y secreta muchas sustancias, entre las que cabría destacar factores autocrinos, paracrinos y endocrinos.

2.1.2. DESARROLLO DEL TEJIDO ADIPOSO

2.1.2.1. Origen

Los conocimientos sobre la formación del tejido adiposo son todavía limitados, aunque suficientes para determinar que el proceso que da lugar a los adipocitos es bastante complejo. Lo que sí está demostrado es que el origen de estas células, al igual que las de los tejidos óseo y muscular, se encuentra en las células mesenquimatosas (Becerril, 2011).

En la figura 3 pueden observarse los diferentes estadios celulares que desembocan en la formación de los adipocitos.

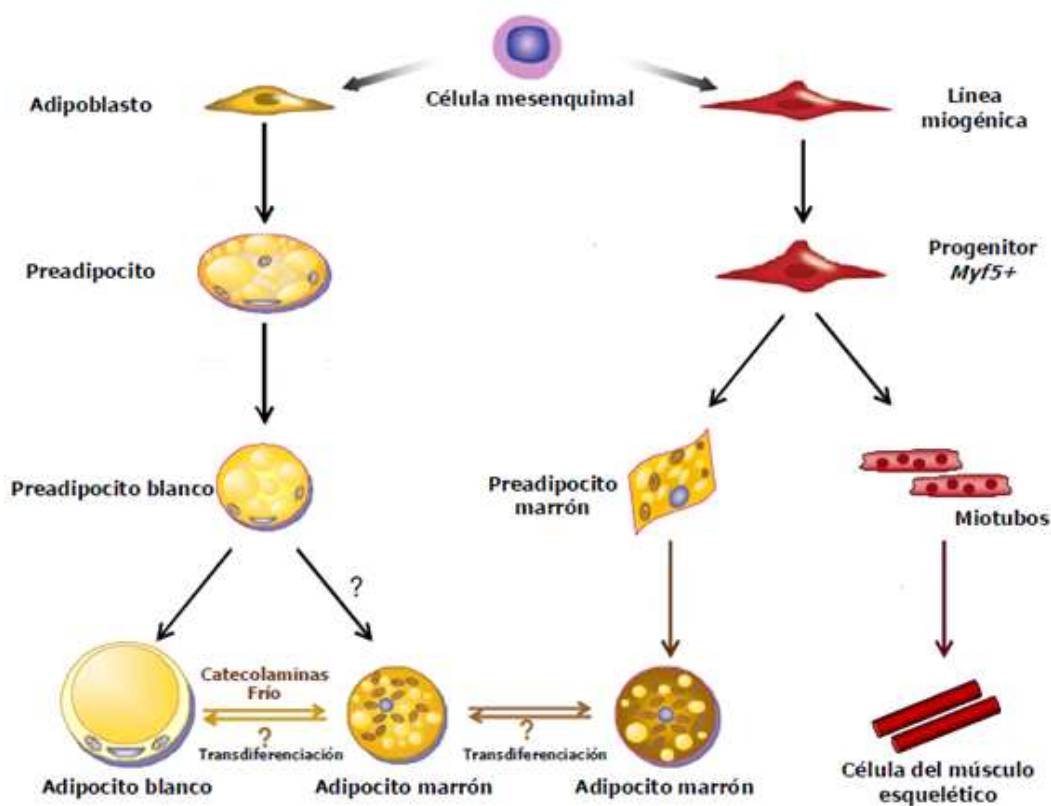


Figura 3. Formación de los adipocitos (adaptado de Becerril, 2011)

A. Adipocitos blancos

La célula madre mesenquimatosa (multipotencial) da lugar a un adipoblasto. Los adipoblastos, células pequeñas que todavía no acumulan grasa, tras exponerse a hormonas y proteínas específicas, se convierten en preadipocitos. Estos ya cuentan en su interior con enzimas lipogénicas y, consecuentemente, con inclusiones lipídicas. Posteriormente, el proceso continúa hasta que los preadipocitos se transforman en adipocitos maduros, ya poseedores de una gran gota de grasa que desplaza al núcleo y los orgánulos hacia la membrana plasmática (Valenzuela, 2000).

B. Adipocitos pardos

El mecanismo de diferenciación de las células del mesénquima en adipocitos pardos difiere de lo expuesto en el caso anterior, ya que, contra lo que se creía hasta hace poco, los adipocitos pardos no se desarrollan a partir de las mismas células que los blancos, sino que comparten origen con las células del músculo esquelético. La proteína PRDM16 es la que determina que la célula precursora dé lugar a un adipocito pardo y no a una célula muscular (Seale *et al.*, 2007 y Seale *et al.*, 2008; cit. Becerril, 2011).

2.1.2.2. Crecimiento

Dos procesos complementarios son los responsables del crecimiento del tejido adiposo: la hiperplasia y la hipertrofia.

La hiperplasia (Figura 4) hace referencia al incremento en el número de preadipocitos, lo que después se traduce en una mayor cantidad de adipocitos (González *et al.*, 2008). Ésta es la principal causa del crecimiento del tejido adiposo durante la etapa fetal y el comienzo de la etapa postnatal (Robelin y Castiella, 1990).

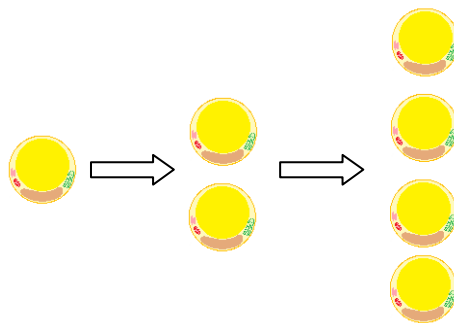


Figura 4. Esquema del proceso de hiperplasia (adaptado de Díaz, 2010)

Se conoce como hipertrofia (Figura 5) al aumento del tamaño de de las células, algo que en el caso de los adipocitos es consecuencia de la acumulación de lípidos (Tokach *et al.*, 2010). Determina el crecimiento del tejido graso en animales adultos en mayor medida que la hiperplasia (Robelin y Castiella, 1990).

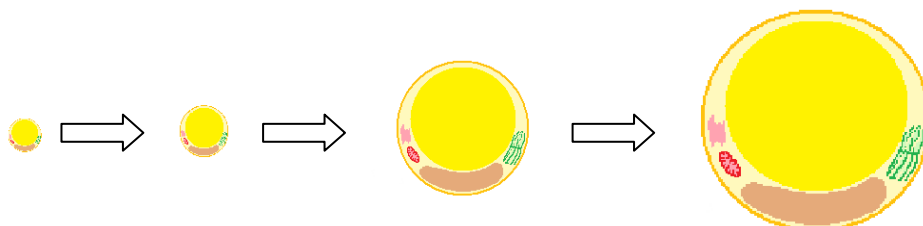


Figura 5. Esquema del proceso de hipertrofia (adaptado de Díaz, 2010)

Además de la edad, el genotipo, el sexo, la raza, la alimentación y el depósito de grasa de que se trate también ejercen influencia sobre el crecimiento del tejido graso (Hood, 1982, Vernon, 1986; cit. Pascual, 2011).

Pascual (2011) analizó el tejido graso de los mismos terneros objeto de estudio de este trabajo fin de carrera. Acerca del crecimiento de este tejido, afirma que “...no hubo procesos de hipertrofia de los adipocitos intramusculares...” y que “...en el depósito subcutáneo se dan los procesos de hiperplasia y esporádicamente el de hipertrofia simultáneamente...”. También señala que es la hiperplasia la que determina el incremento del depósito subcutáneo entre los 6 y los 18 meses de edad.

2.1.2.3. Alometría

A lo largo de la vida de individuo, tanto durante la etapa prenatal como la postnatal, el desarrollo de los diferentes tejidos comienza en momentos distintos y se produce a diferentes velocidades, lo que significa que la proporción de cada órgano respecto a otros órganos o al organismo entero varía a lo largo del tiempo (Caravaca *et al.*, 2003). Este hecho puede ser descrito mediante la siguiente ecuación, propuesta por Huxley en 1932:

$$Y = a \cdot X^b$$

- Y: peso del órgano de que se trate
- a: constante
- X: peso vivo
- b: coeficiente de alometría

La conocida como “ecuación alométrica de Huxley” sirve para describir de forma cuantitativa el crecimiento de una parte del cuerpo con respecto a otras o con respecto al organismo completo (Caravaca *et al.*, 2003)

Si se realiza una transformación logarítmica de esta ecuación, se obtiene otra mediante la que puede expresarse linealmente la relación existente entre el peso de la parte estudiada y el peso de referencia:

$$\text{Log } Y = \text{Log } a + b \text{Log } X$$

Dependiendo del valor del coeficiente de alometría b, se distinguen tres situaciones (Caravaca *et al.*, 2003):

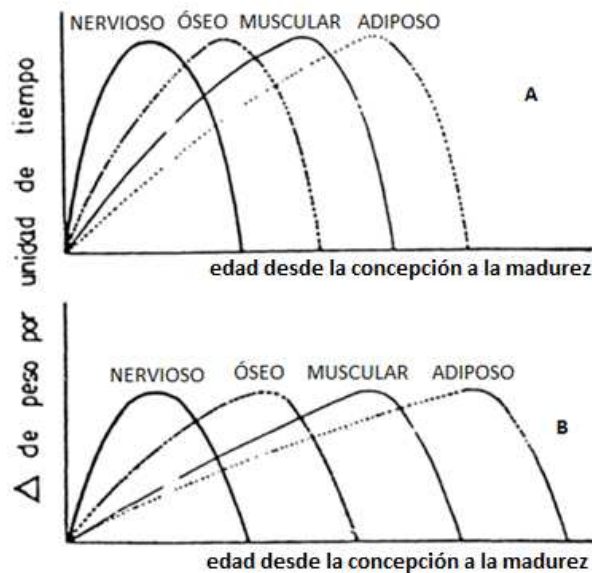
- Si b = 1 quiere decir que el órgano o tejido objeto de estudio se desarrolla a la misma velocidad que el organismo entero (existe isometría).
Ejemplo: músculo.

- Si $b > 1$ significa que el órgano o tejido se desarrolla a menor velocidad que el organismo completo (existe alometría positiva).

Ejemplo: tejido adiposo y testículos.

- Si $b < 1$, el órgano o tejido estudiado se desarrolla más rápidamente que el de referencia (existe alometría negativa).

Ejemplo: cerebro (que se forma antes de nacer) y esqueleto.



A: animal de gran precocidad; B: animal de desarrollo tardío.

Figura 6. Orden de desarrollo de los tejidos (adaptado de Acero, 1994)

El tejido que antes alcanza su máxima velocidad de crecimiento es el tejido nervioso, al que siguen, por este orden, el tejido óseo y el tejido muscular, siendo el tejido adiposo el último en alcanzar su máxima tasa de crecimiento (Acero, 1994). Este hecho puede apreciarse gráficamente en la figura 6.

Pero este crecimiento diferencial no sólo se da entre los distintos tejidos. Los diferentes depósitos grasos también se desarrollan en un orden determinado, tal y como se refleja en la figura 7.

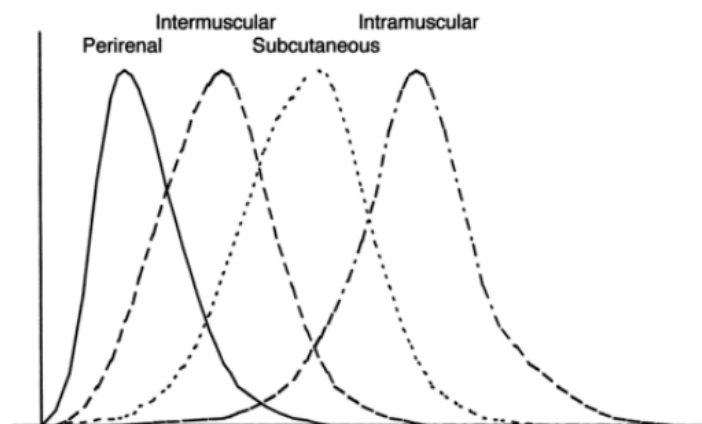


Figura 7. Orden de desarrollo de los depósitos grasos (Sainz y Hasting, 2000)

2.1.3. ALMACENAMIENTO ENERGÉTICO EN EL TEJIDO GRASO

En apartados anteriores ya se ha señalado que la energía excedente que se almacena en el interior de los adipocitos lo hace en forma de triglicéridos, unos compuestos formados por tres ácidos grasos y una molécula de glicerol-3-fosfato. Veamos a continuación las características más destacadas de cada una de estas moléculas.

2.1.3.1. Ácidos grasos

Según la IUPAC (2012) los ácidos grasos son ácidos alifáticos monocarboxílicos que se encuentran de forma esterificada en las grasas, aceites y ceras tanto de origen animal como vegetal. Están formados por una cadena hidrocarbonada con un número variable de carbonos unida a un grupo carboxilo.

La mayoría de los ácidos grasos presentan un número par de carbonos; sólo entre un 1 y un 2 % de los ácidos que posee una grasa natural tiene un número impar de átomos de este elemento (Rodríguez y Simón, 2008). En los rumiantes, estos ácidos grasos son producidos por los microorganismos del rumen, y aparecen tanto en el tejido adiposo como en la leche (Pabón, 2004).

Existen diferentes tipos de ácidos grasos atendiendo a la existencia de dobles enlaces (Figura 8). Hay ácidos grasos que sólo presentan enlaces simples a lo largo de toda la cadena hidrocarbonada: son los llamados saturados. Pero también existen otros ácidos grasos que poseen algún doble enlace y que reciben el nombre de insaturados. Dependiendo del número de dobles enlaces se diferencian en monoinsaturados (con 1 doble enlace) y poliinsaturados (con 2 ó más dobles enlaces).

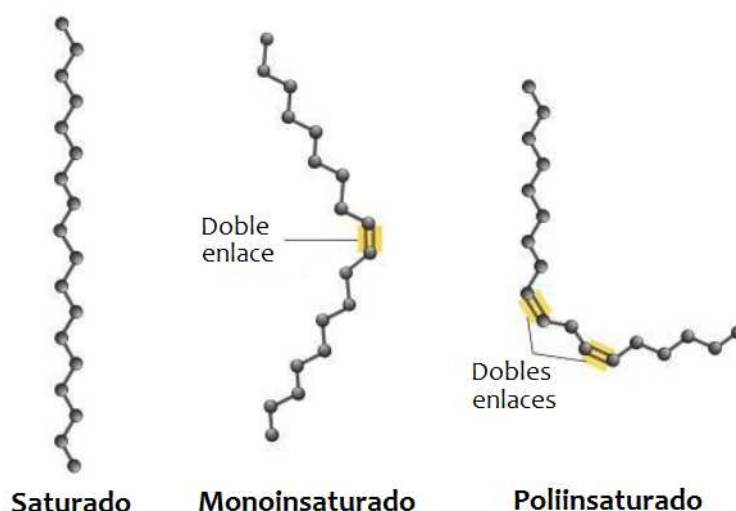


Figura 8. Tipos de ácidos grasos (adaptado de Sizer, Whitney y Piché, 2012)

Los dobles enlaces pueden presentar dos configuraciones espaciales diferentes: cis y trans. Los ácidos grasos con configuración cis (la mayoría) muestran una estructura con una especie de pliegues, mientras que los ácidos grasos trans se asemejan estructuralmente a los saturados, con una disposición más lineal (Figura 9).

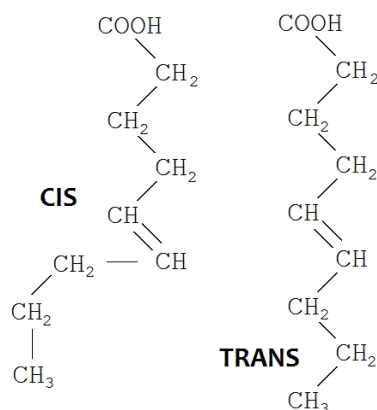


Figura 9. Tipos de ácidos grasos insaturados

Pero los ácidos grasos no se diferencian únicamente en la ausencia o presencia de dobles enlaces en su estructura. También pueden clasificarse según su origen, distinguiendo de este modo entre ácidos grasos esenciales y no esenciales. Los primeros son aquellos que necesariamente deben ser suministrados a través de la dieta, pues no pueden ser sintetizados por el organismo a diferencia de los segundos, que sí son generados por el propio individuo. Esa biosíntesis de ácidos grasos consiste en una sucesión de reacciones metabólicas que se producen en el tejido adiposo, el hígado y la glándula mamaria (Garrido y Teijón, 2006). Según Álvarez (2001) en los animales rumiantes la inmensa mayoría de los ácidos grasos no esenciales (92%) se sintetizan en el tejido adiposo.

Por su parte, los ácidos grasos obtenidos gracias a la digestión son transportados desde los enterocitos hasta las células adiposas a través del sistema circulatorio. Según Martínez *et al.* (2010b), únicamente los ácidos grasos con menos de 12 átomos de carbono son capaces de llegar al torrente sanguíneo de forma libre, a diferencia de los de cadena más larga, que sólo pueden hacerlo si son previamente reesterificados a triglicéridos.

2.1.3.2. Glicerol-3-fosfato

El otro componente de los triglicéridos es el glicerol-3-fosfato, un derivado del glicerol (alcohol de pequeño tamaño que posee tres grupos hidroxilo). La molécula de glicerol-3-fosfato sólo presenta 2 grupos OH, ya que el tercero ha sido sustituido por un grupo fosfato, tal y como puede observarse en la figura 10.

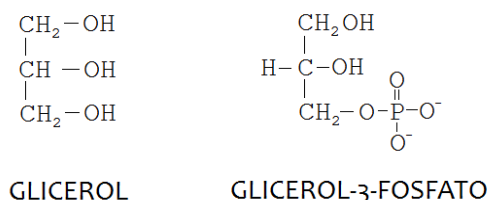


Figura 10. Estructura del glicerol y del glicerol-3-fosfato

El glicerol-3-fosfato es una molécula resultante de la degradación de la glucosa a través de la glucólisis y la vía de las pentosas fosfato. Se produce en el citoplasma de los adipocitos (Figura 13).

Cabe destacar que el glicerol-3-fosfato también es sintetizado a partir del glicerol resultante la degradación de los triglicéridos durante la lipólisis (Fornaguera y Gómez, 2004). Ese glicerol, junto con los ácidos grasos liberados, es transportado por el torrente sanguíneo hasta el hígado, donde se le adiciona un grupo fosfato mediante una reacción catalizada por la enzima glicerocinasa o glicerol quinasa (Pacheco, 2004). Esta enzima, que no se encuentra presente en los adipocitos (Fornaguera y Gómez, 2004), tiene una muy baja actividad en rumiantes, lo que parece indicar que el glicerol no es una fuente importante de glicerol-3-fosfato (Martin y Wilson, 1974; cit. Alzón, 2003).

2.1.3.3. Triglicéridos

En varias ocasiones a lo largo de este trabajo se ha afirmado que la principal función (que no la única) del tejido adiposo es la de servir de reservorio energético que permita al organismo subsistir durante las temporadas en las que se vea privado de alimento. Esa energía almacenada en los adipocitos está contenida en unas moléculas denominadas triglicéridos, triacilglicéridos o triacilgliceroles que están constituidas por tres ácidos grasos y un glicerol-3-fosfato que se unen gracias a sucesivas reacciones de esterificación (Figura 11):

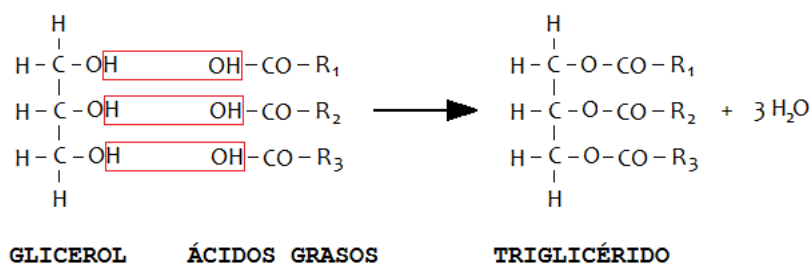


Figura 11. Formación del triglicérido

El proceso mediante el cual se sintetizan triglicéridos se desarrolla en el citoplasma de los adipocitos, además de en el de las células hepáticas y del intestino delgado (Fornaguera y Gómez, 2004). Conviene apuntar que, si bien los triglicéridos producidos

en el hígado y el intestino se distribuyen a otras partes del organismo a través del sistema circulatorio, los generados en el tejido graso no alcanzan el torrente sanguíneo, almacenándose en el interior de los adipocitos a la espera de ser degradados (Gil, 2010).

Para producir los triglicéridos, las células del hígado se sirven de ácidos grasos circulantes o de los que ellas mismas son capaces de sintetizar. Por su parte, el intestino delgado obtiene los ácidos grasos de la degradación que sufren durante la digestión los triglicéridos contenidos en los alimentos (Gil, 2010).

En cuanto al tejido adiposo, ya se ha apuntado que tanto el glicerol-3-fosfato como los ácidos grasos (los no esenciales, los esenciales provienen de la alimentación) son sintetizados en el interior de los adipocitos, lo que se consigue a través de una serie de procesos metabólicos que se desarrollan en el siguiente apartado de este trabajo. Tras su obtención, y en el mismo citoplasma, estas moléculas se asociarán a través de reacciones de esterificación para dar lugar al triglicérido.

2.1.4. LIPOGÉNESIS

A lo largo de las siguientes páginas se desarrollarán brevemente los procesos que intervienen en la síntesis tanto de los ácidos grasos como del glicerol-3-fosfato, en los que las enzimas estudiadas (G3PDH, FAS, ICDH y G6PDH) desempeñan un papel fundamental.

En la figura 12 aparecen representados de forma esquemática las reacciones metabólicas implicadas en la lipogénesis.

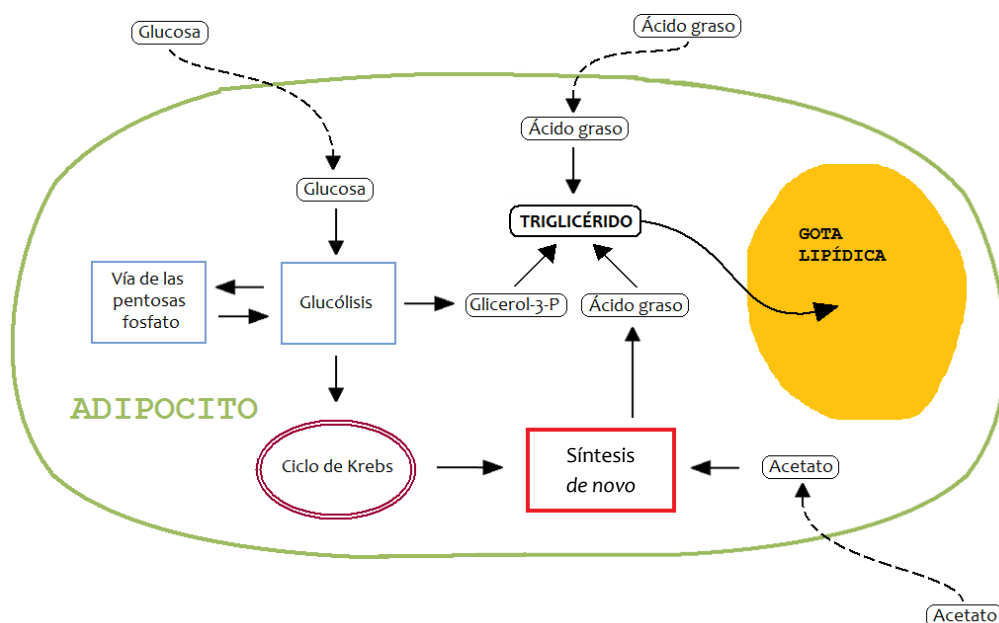


Figura 12. Síntesis de triglicéridos en el adipocito (adaptado de Vernon, 1980)

2.1.4.1. Síntesis de glicerol-3-fosfato

La síntesis de glicerol-3-fosfato se enmarca dentro de los procesos de degradación a los que se ve sometida la glucosa que, procedente del torrente sanguíneo, penetra en las células. Estos procesos, que tal y como muestra la figura 13, están estrechamente relacionados, son la glucólisis y la ruta de las pentosas fosfato.

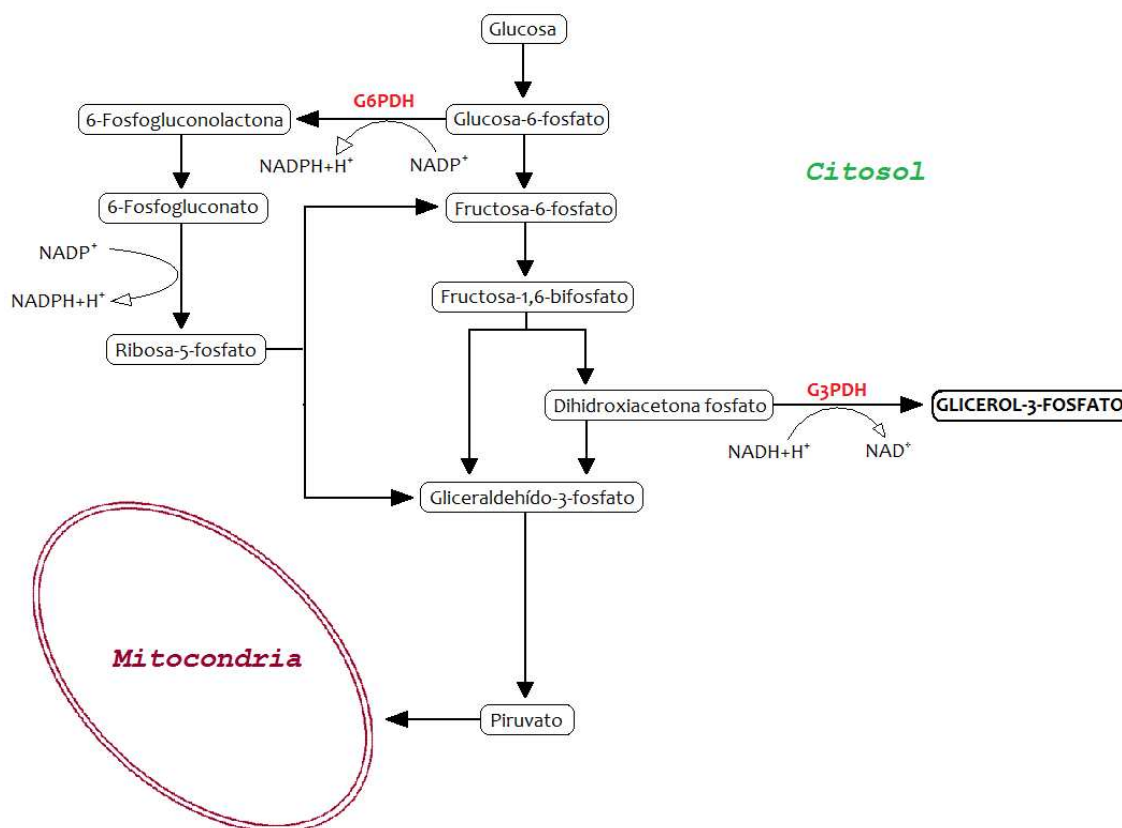


Figura 13. Esquema de la síntesis de glicerol-3-fosfato (adaptado de Vernon, 1980)

La glucólisis es el proceso mediante el cual, a partir de la glucosa, se genera energía en forma de ATP, poder reductor (NADH) y piruvato, un compuesto que servirá de sustrato para otros procesos metabólicos (entre ellos la síntesis de ácidos grasos, tal y como se verá más adelante). Esto es así en la mayoría de las células, pero en los adipocitos, la dihidroxiacetona fosfato puede seguir otro camino y, en vez de evolucionar hacia gliceraldehído-3-fosfato, convertirse en glicerol-3-fosfato por acción de la enzima glicerol 3 fosfato deshidrogenasa (G3PDH) (Figura 14).

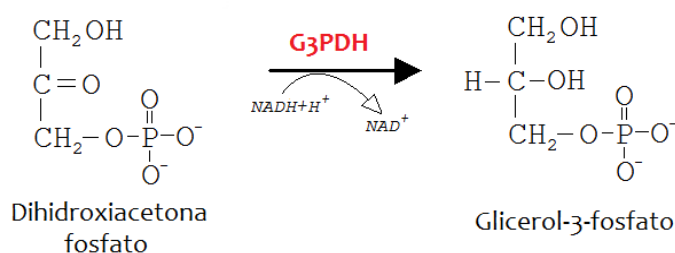
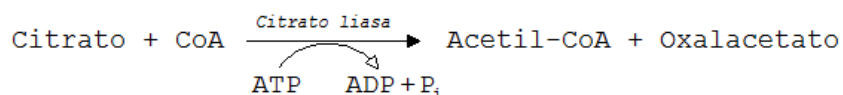


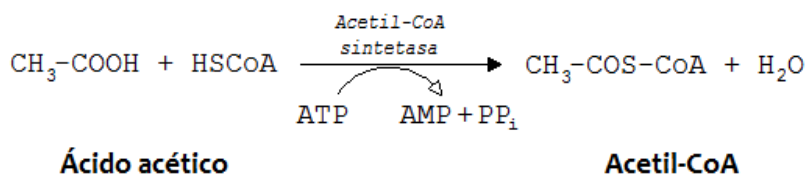
Figura 14. Acción de la enzima glicerol 3 fosfato deshidrogenasa

La generación de ácidos grasos tiene lugar en el citoplasma, por lo tanto, el acetyl-CoA debe salir de la mitocondria. Debido a que la membrana mitocondrial interna es impermeable al acetyl-CoA, éste se asocia con el oxalacetato formando citrato, un compuesto que sí es capaz de atravesar la membrana. Una vez en el citosol, y catalizada por la enzima citrato liasa, se produce la reacción inversa para volver a producir acetyl-CoA y oxalacetato:

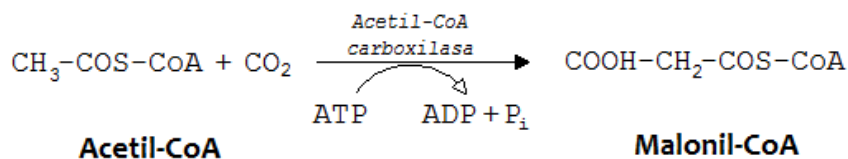


El oxalacetato es reducido a malato mediante la enzima malato deshidrogenasa para posteriormente, a través de una reacción de oxidación en la que interviene la enzima málica, transformarse en piruvato y volver de nuevo al interior de la mitocondria. Durante este proceso se produce NADPH, que será requerido posteriormente para la síntesis de ácidos grasos. Por su parte, el acetyl-CoA servirá de sustrato para la generación de malonil-CoA y palmitato que se llevará a cabo en el citosol celular.

En el caso de los rumiantes, la mayoría del acetyl-CoA se obtiene por otra vía: a partir del abundante ácido acético producido durante la fermentación ruminal. La reacción está catalizada por la enzima acetyl-Coa sintetasa.



Una vez que se dispone de acetyl-CoA en el citosol, la enzima acetyl-CoA carboxilasa cataliza la siguiente reacción, por la que se obtiene malonil-CoA:



REACCIÓN ENZIMÁTICA DE LA ENZIMA SINTETASA DE ÁCIDOS GRASOS

Posteriormente, el acetyl-CoA y el malonil-CoA darán lugar al ácido palmítico (Figura 16) mediante una sucesión de reacciones, catalizadas por la enzima FAS (Sintetasa de Ácidos Grasos), cuya actividad es estudiada en el presente trabajo.

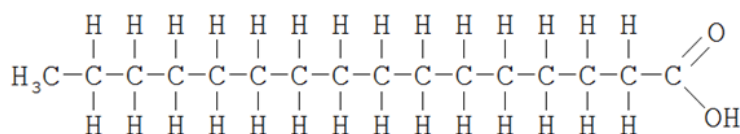
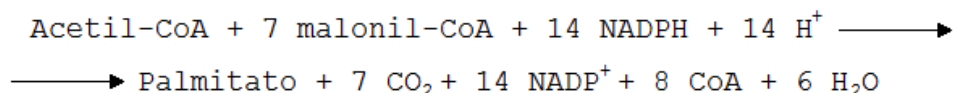


Figura 16. Molécula de ácido palmítico

La Sintetasa de Ácidos Grasos es en realidad un complejo multienzimático compuesto por 7 enzimas más una proteína, denominada proteína transportadora de grupos de acilo. A continuación se muestra la reacción global que da lugar al ya citado ácido palmítico, un ácido graso saturado que posee 16 átomos de carbono:



A partir del ácido palmítico se sintetizarán ácidos grasos (tanto saturados como insaturados) de cadena más larga (Figura 17).

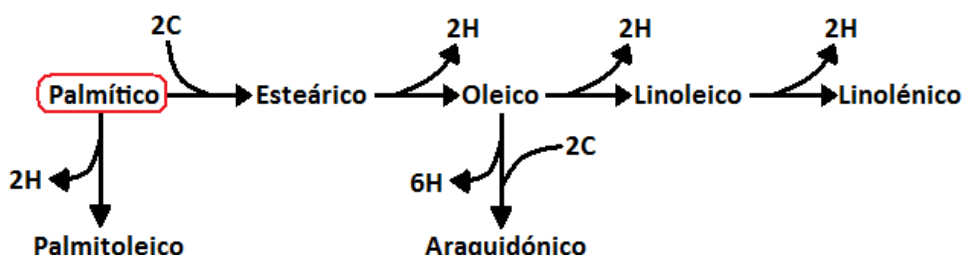


Figura 17. Formación de AG a partir del ácido palmítico (adaptado de Peña *et al.*, 2004)

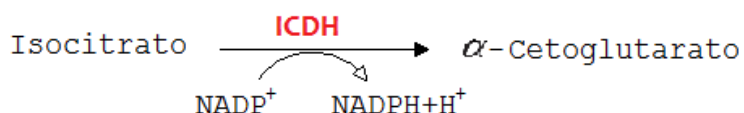
La síntesis de ácidos grasos saturados con un mayor número de carbonos se lleva a cabo gracias a la acción de las elongasas, unas enzimas presentes tanto en las mitocondrias como en el retículo endoplasmático. En el interior de las mitocondrias el donador de los carbonos necesarios para que se produzca la elongación de la cadena es el aceti-CoA, mientras que en el retículo endoplasmático los átomos de carbonos proceden del malonil-CoA (Muriana, 2004).

Por su parte, los ácidos grasos insaturados se forman gracias a la deshidrogenación de los saturados por acción de las desaturasas (Voet y Voet, 2006).

REACCIÓN ENZIMÁTICA DE LA ENZIMA ISOCITRATO DESHIDROGENASA

El NADPH necesario para que se lleven a cabo las reacciones que darán lugar al ácido palmítico tiene tres orígenes bien diferenciados, como puede observarse en la figura 15:

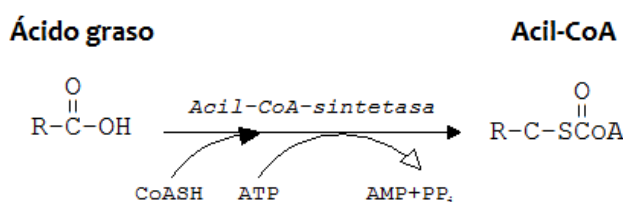
- Ruta de las pentosas fosfato, gracias a, entre otras, la enzima G6PDH.
- Acción de la enzima málica, que cataliza la reacción por la que el malato se transforma en piruvato.
- Acción de la enzima isocitrato deshidrogenasa (ICDH). Esta enzima cataliza la reacción siguiente:



El isocitrato que interviene en la misma procede del citrato que sale desde la mitocondria (ciclo de Krebs) al citoplasma, y que en vez de descomponerse en oxalacetato y acetil-CoA (tal y como se ha explicado con anterioridad) sigue este otro camino. Posteriormente, el α -cetoglutarato regresa a la matriz mitocondrial para reincorporarse al ciclo de los ácidos tricarbóxicos.

2.1.4.3. Síntesis de triglicéridos

Como paso previo a la síntesis de triglicéridos, se requiere que los ácidos grasos sufran un proceso de activación, o lo que es lo mismo, que se les adicione una molécula de coenzima-A mediante una reacción catalizada por la acil-CoA-sintetasa. El producto resultante, es decir, el ácido graso activado, recibe el nombre de acil-CoA independientemente del número de carbonos que posea.



Una vez concluida la activación de los ácidos grasos ya pueden producirse las reacciones de esterificación entre estos y la molécula de glicerol-3-fosfato. La figura 18 muestra la sucesión de reacciones que darán lugar al triglicérido.

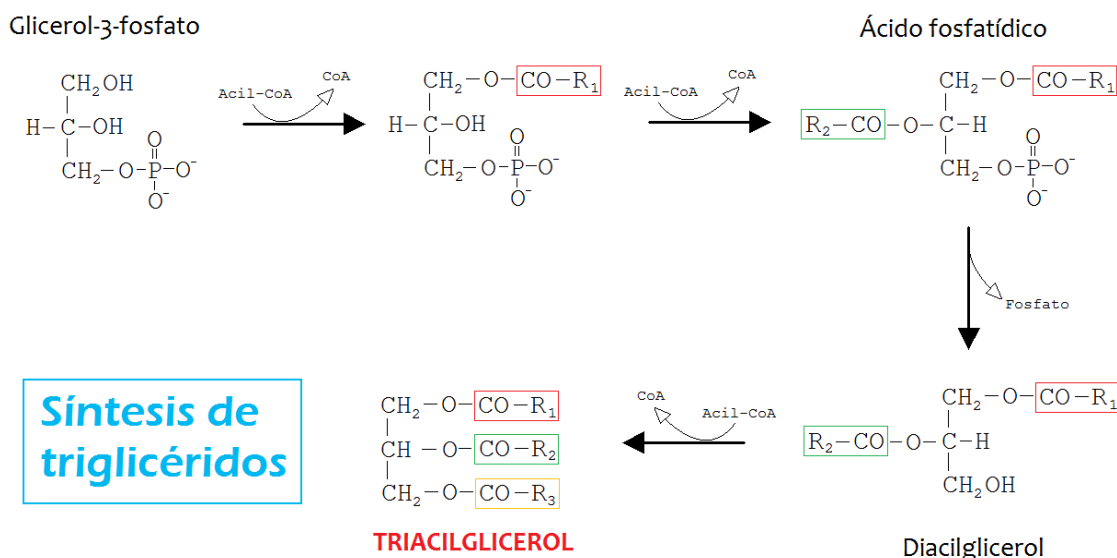


Figura 18. Formación del triglicérido

Los dos primeros ácidos grasos acoplados a la molécula de glicerol-3-fosfato logran unirse a él gracias a la actividad de la enzima aciltransferasa, que es la encargada de catalizar las reacciones que dan lugar al ácido fosfatídico. En este punto existen dos posibilidades: que el ácido fosfatídico se transforme en un glicerofosfolípido o que

evolucione hasta formar un triglicérido. La ruta que finalmente siga dependerá de las necesidades que en ese momento tenga el organismo.

Para que el tercer ácido graso logre asociarse con ácido fosfatídico, éste debe previamente perder el grupo fosfato, lo que sucede mediante la reacción que cataliza la enzima ácido fosfatídico fosfatasa. Como resultado, el ácido fosfatídico se transforma en 1,2 – diacilglicerol, molécula que recibe el último de los ácidos grasos por medio de una reacción catalizada por la enzima aciltransferasa y que finalmente da lugar al triglicérido.

2.2. DIGESTIÓN Y METABOLISMO DE LOS LÍPIDOS EN LOS RUMIANTES

En este apartado se desarrollarán brevemente las transformaciones más importantes que sufren los lípidos al atravesar el tracto digestivo de los rumiantes, así como la producción de ácidos grasos volátiles, fundamentalmente derivados de la fermentación de los hidratos de carbono. Pero antes de nada, con la intención de comprender mejor estos procesos, parece conveniente dedicar unas líneas a comentar los aspectos más destacados del peculiar sistema digestivo de estos animales.

2.2.1. APARATO DIGESTIVO DE LOS RUMIANTES

Es bien conocido que, mientras que en los animales monogástricos el estómago consta de una única cavidad, en los rumiantes se distinguen cuatro compartimentos: el rumen, el retículo, el omaso y el abomaso. Estas estructuras pueden observarse en la figura 19, en la que también se señala el recorrido seguido por el alimento desde que lo toma el animal hasta que alcanza el intestino.

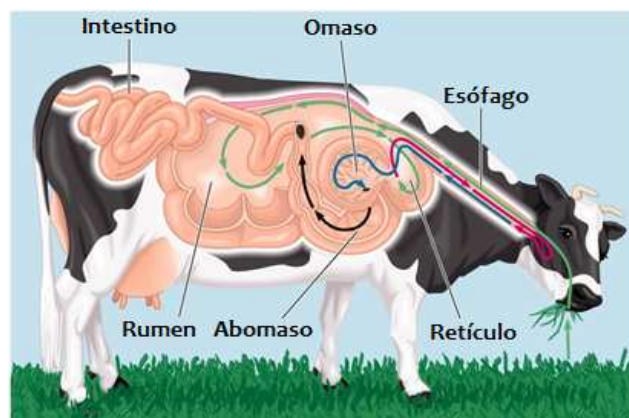


Figura 19. Partes del tubo digestivo de los rumiantes (adaptado de Addison Wesley Longman Inc, 1999)

Mediante la rumia, el alimento (que ha permanecido durante un tiempo en el rumen y el retículo) regresa de nuevo a la boca, es masticado y posteriormente, de nuevo ingerido. Finalmente, tras atravesar el omaso y el abomaso, llega al intestino, lugar en el que son absorbidos la mayoría de los nutrientes.

A continuación se exponen de forma breve las características más importantes de cada uno de los compartimentos que conforman el estómago de los animales rumiantes, así como sus funciones principales.

2.2.1.1. El rumen o panza

El rumen o panza, situado en la cavidad abdominal izquierda, es el compartimento estomacal de mayor tamaño en los rumiantes adultos. Estructuralmente es una especie de saco con las paredes internas recubiertas por multitud de papilas que hacen que aumente considerablemente su superficie; König, Sautet y Liebich (2005) afirman que ésta puede incrementarse en torno a 7 veces.

El tamaño, así como la densidad y la forma de las papilas ruminales varían en función de la alimentación. Dietas con alta concentración energética favorecen el desarrollo de estas estructuras mientras que, por el contrario, la ingesta de alimentos con poca energía provocan su acortamiento (König, Sautet y Liebich, 2005; Hutjens, 2003)

El rumen contiene en su interior una importante población microbiana, compuesta fundamentalmente por bacterias y protozoos (Caravaca *et al.*, 2003), responsable de los procesos fermentativos que sufren los alimentos que, procedentes de la boca, llegan a la panza a través del esófago.

Como consecuencia de la fermentación ruminal se generan ácidos grasos volátiles como el ácido acético, con un importante papel en la síntesis de triglicéridos, el ácido propiónico o el ácido butírico, además de otros productos de los que el rumiante debe deshacerse. Entre ellos destacan el metano y el dióxido de carbono (gases que se expulsan por medio de los eructos o a través de los pulmones) y el amoníaco (Caravaca *et al.*, 2003).

2.2.1.2. El retículo o redecilla

Este otro compartimento se localiza justo delante del rumen, al que se encuentra unido por el conocido como pliegue ruminoreticular (König, Sautet y Liebich, 2005)

Como en el caso anterior, en el retículo también se produce la fermentación de los alimentos (Hutjens, 2003).

Debido a que entre el rumen y el retículo no existe ningún esfínter y a que en ambas cavidades el alimento sufre las mismas transformaciones puede decirse que estos dos compartimentos constituyen una unidad morfológica y funcional (Dijkstra, Forbes y France, 2005).

2.2.1.3. El omaso o librillo

Localizado a la derecha del rumen, el omaso es un compartimento de forma esférica que comunica el retículo con el abomaso. La razón de que reciba el nombre de librillo se debe a la existencia en su interior de entre 100 y 130 láminas que recuerdan a las hojas de un libro (Gloobe, 1989).

Todavía no se conoce con certeza qué función desempeña, aunque se sabe que en él se absorben agua, electrolitos inorgánicos, ácidos grasos volátiles y amoníaco. Éste último, y al parecer también algunos de esos ácidos grasos volátiles, son generados en el omaso (Dijkstra, Forbes y France, 2005).

2.2.1.4. El abomaso o cuajar

El abomaso está considerado como el estómago verdadero de los rumiantes ya que sus paredes poseen glándulas que secretan enzimas digestivas como ocurre en los animales monogástricos (Hutjens, 2003).

Está situado a la derecha del rumen y hasta él llega el alimento procedente del omaso para terminar de ser digerido.

2.2.2. DIGESTIÓN DE LOS LÍPIDOS

Bajo el término lípido se encuentran englobadas diversas sustancias orgánicas que, aunque poseen estructuras distintas, presentan una propiedad común: el ser insolubles en agua pero solubles en disolventes orgánicos apolares como el éter o el cloroformo (Melo y Cuamatzi, 2007). En la tabla 1 se muestran los tipos de lípidos existentes y sus características más importantes.

CLASIFICACIÓN		COMPONENTES	
SAPONIFICABLES	Sencillos	Grasas (triglicéridos)	Glicerol + 3 ácidos grasos
		Ceras	Alcohol + 1 ácido graso de cadena larga
	Compuestos	Fosfolípidos	Glicerol + 2 ácidos grasos + 1 grupo fosfato
		Esfingolípidos	Esfingosina + 1 ácido graso + 1 grupo fosfato + 1 colina
		Glucolípidos	Glicerol + 2 ácidos grasos + 1 azúcar (galactosa)
		Lipoproteínas	Lípidos asociados a proteínas
NO SAPONIFICABLES		Esteroides	No poseen ácidos grasos
		Terpenos	
		Carotenoides	
		Pigmentos vegetales	
		Vitaminas liposolubles	

Tabla 1. Clasificación y componentes de los lípidos (adaptado de Ureña, 2013)

Los herbívoros no ingieren grandes cantidades de lípidos: según Ureña (2013), estos sólo representan entre un 4 y un 6 % de sus raciones, aunque su importancia como fuente de energía es muy superior.

Debido a la acción de los microorganismos contenidos en el complejo retículo-rumen, los lípidos ingeridos por el animal sufren dos transformaciones sucesivas: hidrólisis y biohidrogenación (Martínez *et al.*, 2010a). Estos procesos se describen en la figura 20.

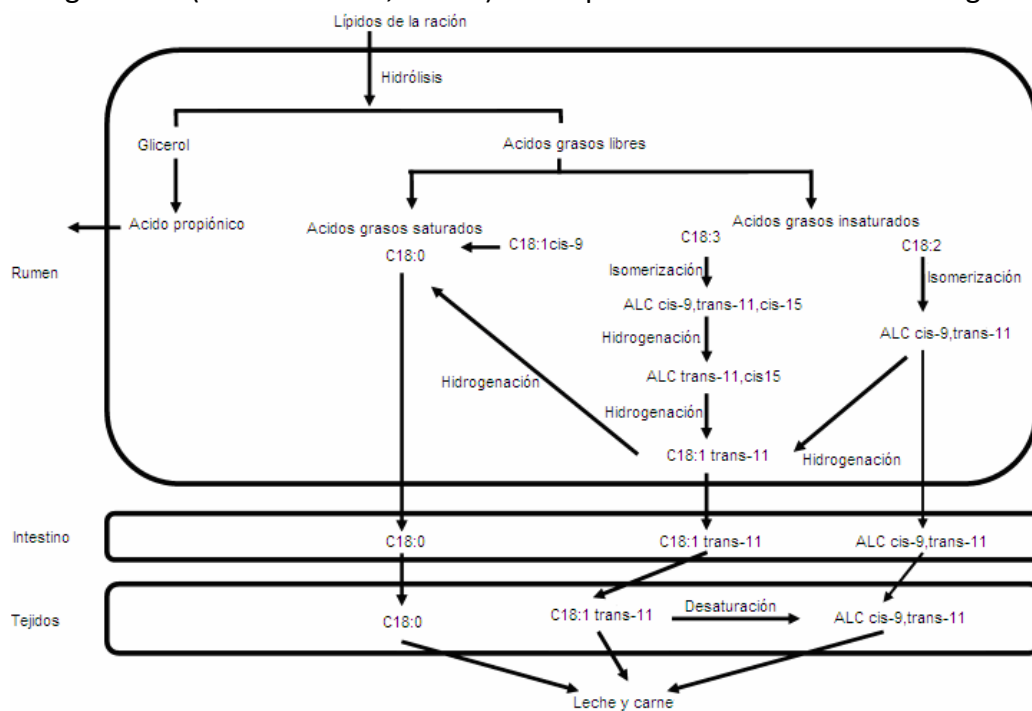


Figura 20. Digestión de los lípidos en los rumiantes (Martínez *et al.*, 2010b).

C18:0, ácido esteárico; C18:1, ácido oleico; C18:1trans-11, ácido vaccénico; C18:2, ácido linoleico; C18:2cis-9,trans-11, ácido ruménico; C18:3, ácido linolénico.

2.2.2.1. Hidrólisis

Gracias a la acción de las lipasas bacterianas, que rompen los enlaces éster de los triglicéridos, glicolípidos y fosfolípidos, estos se degradan dando lugar a glicerol y ácidos grasos como puede apreciarse en la figura 21.



Figura 21. Hidrólisis de los lípidos en el rumen (van Lier y Regueiro, 2008)

El glicerol obtenido de la descomposición de estos lípidos pasará a convertirse, tras fermentar, fundamentalmente en ácido propiónico (van Lier y Regueiro, 2008). Por su parte, los ácidos grasos insaturados que hayan sido liberados serán hidrogenados, tal y como se verá a continuación.

No todos esos ácidos grasos insaturados sufren la biohidrogenación, ya que los microbios utilizan parte de los ácidos grasos liberados para sintetizar los fosfolípidos que posteriormente pasarán a formar parte de sus membranas celulares (Ureña, 2013).

Según Pabón (2004), al cabo de 1 hora el 60 % de los lípidos son hidrolizados y tras 5 horas, el 85 %. Otros autores señalan que el proceso es todavía más rápido, hidrolizándose en menos de una hora el 90 % de los lípidos (Immig et al., 1993; cit. de Blas, 2004).

Existen diversos factores que pueden influir sobre la lipólisis. Por ejemplo, los antibióticos (Van Nevel y Demeyer, 1995; cit. Martínez *et al.*, 2010a) o un pH ruminal bajo (Van Nevel y Demeyer, 1996; cit. Martínez *et al.*, 2010a) disminuyen los niveles de hidrólisis, al igual que el aumento de grasa en la ración o un alto punto de fusión de la misma (Beam *et al.*, 2000; cit. Martínez *et al.*, 2010a). El uso de jabones cálcicos o de semillas enteras también disminuye los niveles de hidrogenación, al encontrarse las grasas protegidas (Doreau y Ferlay, 1994; cit. De Blas, 2004).

2.2.2.2. Biohidrogenación

A pesar de que la mayoría de los ácidos grasos contenidos en la dieta de los rumiantes son insaturados (Tabla 2), tanto los diferentes depósitos adiposos como la leche presentan una elevada proporción de ácidos grasos saturados. Esta aparente contradicción se debe a la biohidrogenación que tiene lugar en el rumen, consistente en la sustitución de los enlaces dobles de los ácidos insaturados por dos átomos de hidrógeno (van Lier y Regueiro, 2008).

	AG (g/100 g MS)	Ácidos grasos (g/100 g AG)							
		14:0	16:0	16:1	18:0	18:1	18:2	18:3	20:0
CEREALES									
Cebada	1,6		27,6	0,9	1,5	20,5	43,3	4,3	
Maíz	3,2	0,1	16,3		2,6	30,9	47,8	2,3	
Avena	3,2	0,1	22,1	1,0	1,3	38,1	34,9	2,1	
Trigo	1,0	0,1	20,0	0,7	1,3	17,5	55,8	4,5	
FORRAJES									
Alfalfa deshidratada	1,4	0,7	28,5	2,4	3,8	6,5	18,4	39,0	
Ray-grass perenne		0,2	11,9	1,7	1,0	2,2	14,6	68,2	
Trébol blanco		1,1	6,5	2,5	0,5	6,6	18,5	60,7	2,0
SEMILLAS OLEAGINOSAS									
Algodón	18,6	0,8	25,3		2,8	17,1	53,2	0,1	0,1
Colza	38,0		4,3	0,3	1,7	59,1	22,8	8,2	0,5
Soja	18,0	0,2	10,7	0,3	3,9	22,8	50,8	6,8	0,2
Girasol	34,7	0,1	5,5		3,6	21,7	68,5	0,1	0,1

Tabla 2. Composición en ácidos grasos de algunos alimentos (Palmquist, 1996)

C14:0, ácido mirístico; C16:0, ácido palmítico; C16:1, ácido palmitoleico; C18:0, ácido esteárico; C18:1, ácido oleico; C18:2, ácido linoleico; C18:3, ácido linolénico; C20:0, ácido araquídico.

Mediante la biohidrogenación, los ácidos grasos insaturados que formaban parte de los lípidos hidrolizados pasan a convertirse en saturados por acción de los microorganismos, entre los que cabe destacar la bacteria *Butyrivibrio fibrisolvens* (Pérez, 2010). Por su parte, los ácidos grasos saturados liberados tras los procesos de hidrólisis no se ven alterados (Martínez *et al.*, 2010a).

Urrutia (2010) señala que, tras la hidrólisis, entre el 70 y el 90 % de los ácidos grasos libres son hidrolizados. Según la misma autora, el resto es aprovechado por los microorganismos, mediante los cuales llegan ácidos grasos insaturados al intestino, lugar en el que son absorbidos.

2.2.2.3. Absorción en el intestino

Entre el 85 y el 90% de los ácidos grasos que abandonan el rumen son ácidos grasos saturados (como el ácido palmítico y el esteárico) adsorbidos a partículas de alimento y a microbios, a los que hay que añadir los integrantes de los fosfolípidos de las membranas de los microorganismos, que suponen del 10 al 15 % restante (Wattiaux y Grummer, 2013).

El intestino delgado es el lugar donde finaliza la digestión y se absorben los nutrientes. Se liberan los ácidos grasos transportados por los microorganismos en sus membranas y junto con el resto de ácidos grasos libres son absorbidos por las células intestinales gracias a la bilis y a las sustancias secretadas por el páncreas, que permiten la creación de partículas capaces de introducirse en los enterocitos (Wattiaux y Grummer, 2013).

Los ácidos grasos con menos de 12 átomos de carbono llegan a la circulación sanguínea de forma libre (Hocquette y Bauchart, 1999; cit. Martínez *et al.*, 2010b), mientras que los ácidos grasos con 12 ó más carbonos tienen que ser esterificados, dando lugar a triglicéridos y fosfolípidos (Cuvelier y col., 2005; cit. Martínez *et al.*, 2010b).

Los triglicéridos, como consecuencia de tratarse de moléculas hidrófobas, no pueden discurrir libres por la sangre. Para poder circular por los vasos sanguíneos es preciso que previamente entren a formar parte de unas partículas denominadas lipoproteínas (Voet y Voet, 2006), cuya estructura se representa en la figura 22.

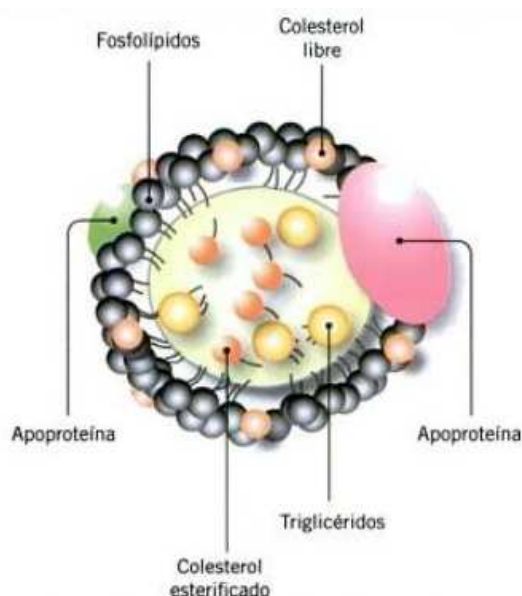


Figura 22. Estructura de las lipoproteínas (Gil, 2010)

Las lipoproteínas constan de una cubierta de forma esférica compuesta por fosfolípidos, colesterol no esterificado y proteínas que contiene en su interior lípidos apolares (Gil, 2010).

Las células del intestino sintetizan dos tipos de lipoproteínas: los quilomicrones y las lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL) (Palmquist y Jenkins, 1980; cit. Martínez *et al.*, 2010b). Gracias a la acción de la lipoproteína lipasa (LPL), una enzima existente en las paredes de los capilares sanguíneos, los triglicéridos transportados en las VLDL y los quilomicrones liberan los ácidos grasos que, finalmente, se introducen en los adipocitos por medio de proteínas transportadoras (Moreno y Martínez, 2002).

En lo que respecta a los ácidos grasos con un número de carbonos inferior a 12, estos circulan por el torrente sanguíneo unidos a la albúmina sérica (Devlin, 2004).

2.2.3. ÁCIDOS GRASOS VOLÁTILES

Los ácidos grasos existentes en el rumen no sólo proceden de los lípidos contenidos en el alimento. La fermentación de los glúcidos producida por los microorganismos es también una importante fuente de unos ácidos grasos conocidos como volátiles (AGV), o lo que es lo mismo, con un número de carbonos igual o inferior a seis. Los AGV más abundantes son el ácido acético, el ácido propiónico y el ácido butírico (Wattiaux y Armentano, 2013).

2.2.3.1. Producción de ácidos grasos volátiles

Los AGV proceden en su mayoría de los procesos fermentativos sufridos por los hidratos de carbono en el rumen y el retículo (tabla 3).

CATEGORÍA DE CARBOHIDRATO	TIPO	PASO RUMINAL	SUSTRATO DE DIGESTIÓN (%)	AGV
No estructurales	Azúcares	Muy rápido	100	Propionato
	Almidones	Rápido	70-90	Propionato
Estructurales	Lignina	Muy lento	0	Ninguno
	Celulosa	Lento	30-50	Acetato - butirato
	Hemicelulosa	Moderado	70	Acetato - propionato
	Pectina	Rápido	70-90	Acetato - propionato

Tabla 3. Origen de los AGV (Hutjens, 2003)

La cantidad de AGV producidos varía en función de los ingredientes de la ración y más concretamente del tipo de glúcidos contenidos en los alimentos (Figura 23). Dietas ricas en forrajes, o lo que es igual, con elevados niveles de fibra, favorecen la

producción de ácido acético. Por el contrario, los hidratos de carbono no – fibrosos hacen que la producción de ácido propiónico aumente, además de generar cantidades superiores de AGV (Wattiaux y Armentano, 2013).

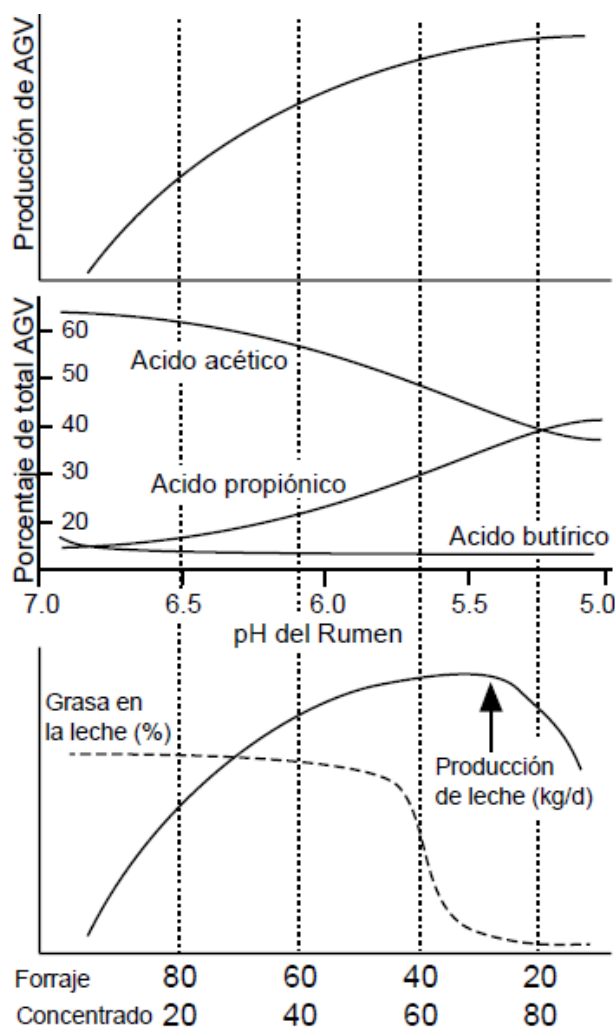


Figura 23. Influencia de la dieta sobre los AGV y la producción de leche (Wattiaux y Armentano, 2013)

A partir de una molécula de glucosa (que posee 6 carbonos) pueden generarse (van Lier y Regueiro, 2008):

- 2 moléculas de ácido acético (con dos átomos de carbono cada una). Sobran 2 carbonos.
- 2 moléculas de ácido propiónico. Los 6 carbonos de la glucosa sirven para sintetizar 2 moléculas con 3 átomos de carbono cada una.
- 1 molécula de ácido butírico (posee 4 átomos de carbono, por lo que en este caso también sobran 2 carbonos).

Los átomos de carbono sobrantes de la síntesis de acetato y butirato pasan posteriormente a formar parte del dióxido de carbono y del metano que también se crean en el rumen (Figura 24) (van Lier y Regueiro, 2008).

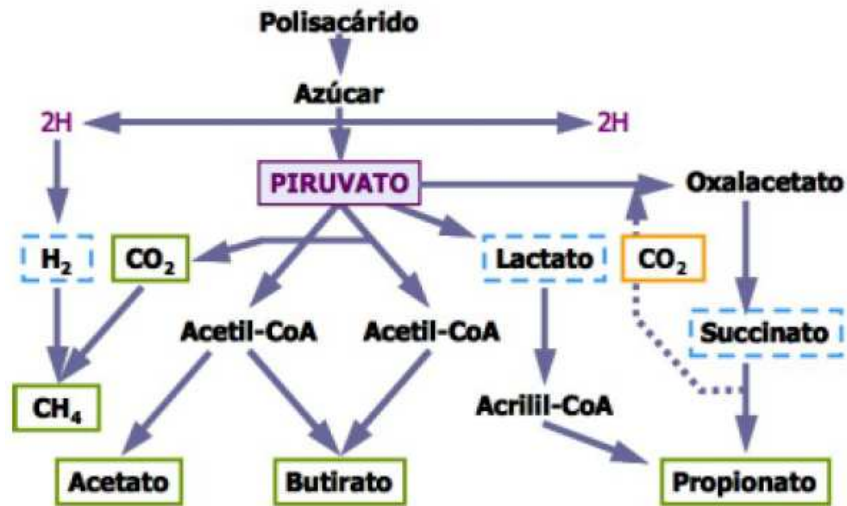
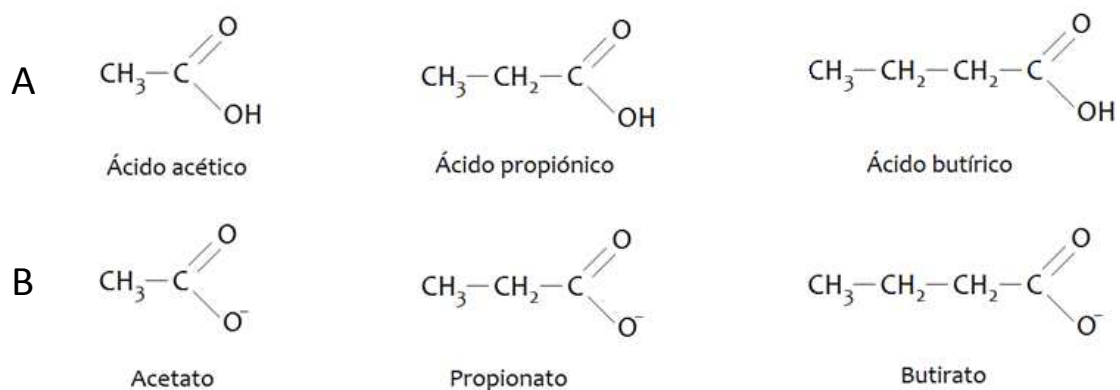


Figura 24. Vías metabólicas de producción de acetato, butirato y propionato (van Lier y Regueiro, 2008)

2.2.3.2. Absorción de ácidos grasos volátiles

La mayoría de los AGV producidos (en torno al 80 %) es absorbida en el rumen, el 15 % lo es en el omaso y el 5% restante en el intestino (Álvarez *et al.*, 2009). Como consecuencia del pH del rumen, la mayor parte de los AGV aparecen disociados (Figura 25) y, aunque tanto las formas disociadas como las no disociadas pueden pasar del rumen al epitelio ruminal, sólo los ácidos no ionizados son capaces de llegar al torrente sanguíneo (van Lier y Regueiro, 2008). Esto ralentiza la velocidad de absorción, pues para poder pasar a la sangre tienen que asociarse previamente con un hidrogenión (van Lier y Regueiro, 2008).



A: Forma liposoluble B: Forma disociada

Figura 25. Principales ácidos grasos volátiles

El AGV que se absorbe más rápidamente es el ácido butírico, seguido por el ácido propiónico (Mora, 1991).

Modificaciones sufridas por los AGV (tabla 4)

El ácido acético no sufre modificaciones en el momento de ser absorbido por las papilas del rumen, donde una fracción servirá para proporcionar energía a sus células. Tras atravesar la pared ruminal, una parte llega al hígado y el resto se distribuye por los músculos esqueléticos, el corazón, los órganos digestivos, los riñones, la glándula mamaria y el tejido adiposo (Álvarez *et al.*, 2009).

Una pequeña cantidad de ácido propiónico se transforma en ácido láctico en el epitelio ruminal (Álvarez *et al.*, 2009; Mora, 1991), pero la mayoría logra atravesarlo sin sufrir cambios.

Todo lo contrario ocurre en el caso del ácido butírico, pues casi todo él se transforma en ácido beta hidroxibutírico en el epitelio del rumen (Mora, 1991).

LUMEN RUMINAL	EPITELIO RUMINAL	VENA PORTAL
Ácido acético	Ácido acético	Ácido acético
Ácido propiónico	Ácido láctico	Ácido láctico
	Ácido propiónico	Ácido propiónico
Ácido butírico	Ácido beta hidroxibutírico	Ácido beta hidroxibutírico

Tabla 4. Cambios sufridos por los AGV en el epitelio del rumen (adaptado de Mora, 1991)

2.2.3.3. Función de los ácidos grasos volátiles

Los ácidos grasos volátiles constituyen la principal fuente de energía para los rumiantes, proporcionándoles entre el 70 y el 80 % de la energía que estos animales requieren (Fahey y Berger, 1993; cit. Dalmau, 2005). Por ejemplo, un mol de ácido acético genera 10 moles de ATP (Osorio y Vinazco, 2010).

- El ácido acético tiene un papel protagonista en la lipogénesis, pues a partir de él se genera la mayoría del acetyl-CoA que interviene en el proceso de síntesis de ácidos grasos.
- Por su parte, el ácido propiónico interviene en la gluconeogénesis que tiene lugar en el hígado. Una vez convertido en glucosa, ésta se aprovechará como fuente de energía en aquellos tejidos que así lo requieran (como el nervioso o el cardíaco), además de ser precursora del glucógeno y la lactosa (Bueno *et al.*, 2009).

- En cuanto al ácido butírico, éste sufre una mayor alteración que los anteriores ya que la mayoría se transforma en una cetona (la β -hidroxibutirato), en la pared ruminal (Wattiaux y Armentano, 2013). Estos cuerpos cetónicos servirán de fuente de energía para el corazón, los riñones, el cerebro y los músculos (Álvarez *et al.*, 2009).

2.3. RAZA PIRENAICA

Los terneros cuya grasa ha sido estudiada pertenecen a la raza Pirenaica, una raza autóctona de Navarra y de otros territorios cercanos como Guipúzcoa, Vizcaya, Álava y Aragón. Al borde de la extinción hace unos cincuenta años, los trabajos llevados a cabo con el objeto de evitar su desaparición han dado sus frutos y en la actualidad existen asociaciones de Pirenaica en Cantabria, País Vasco, Navarra, Aragón y Cataluña. También pueden encontrarse explotaciones en La Rioja, Soria, Burgos, León, Segovia Cáceres, Castellón y Madrid aunque en estas zonas su presencia es mucho menos importante (CONASPI, 2013).

2.3.1. RESEÑA HISTÓRICA

En opinión de Echeverría y Asarta (1976), la raza Pirenaica descendería del *Bos taurus brachyceros*, de MAYER, y del *Bos taurus primigenius*, de BOJANUS.

Antiguamente esta raza llegó a extenderse desde Vizcaya hasta el Pirineo leridano (Lafitte, 1927; cit. Echeverría y Asarta, 1976).

A partir del siglo XIX, tanto la Diputación Foral de Vizcaya como la de Guipúzcoa, apuestan claramente por la mejora de esta raza autóctona mediante la organización de Concursos – Exposiciones de ganado y la creación de varios centros como la Granja Modelo de Erandio (1851), la Granja de Yurramendi en Tolosa (1857), la Granja Modelo de Fraisoro (1896) y los Caseríos Modelo de Abadiano y Zalla (1900 y 1905) (Mendizábal *et al.*, 1998).

En 1905, siguiendo las recomendaciones del director de la Granja Modelo de Fraisoro, el ingeniero agrónomo francés Henri Delaire, la Diputación Foral de Guipúzcoa establece el Libro Genealógico de la raza Pirenaica, lo que la convirtió en la primera raza española en disponer de un Herd-book. En la documentación que Delaire entrega a la Comisión de Agricultura y Ganadería de la Diputación Foral el ingeniero se lamenta de la delicada situación en la que se encuentra el ganado Pirenaico como consecuencia de los cruzamientos incontrolados con otras razas foráneas, sobre todo la Parda Alpina (Mendizábal, Ibarbia y Etxaniz, 2005).

A pesar de que los primeros años del siglo XX son muy positivos para el ganado Pirenaico, obteniendo premios en los Concursos Nacionales de Ganado y Maquinaria Agrícola celebrados en Madrid en 1908 y 1913, poco a poco comienzan a imponerse los cruzamientos con individuos de Parda Alpina. Esta raza irá paulatinamente sustituyendo a la autóctona hasta dejarla al borde de la extinción en la década de los 60 del pasado siglo (Mendizábal, Ibarbia y Etxaniz, 2005).

Echeverría y Asarta (1976) señalan que la raza Pirenaica desapareció por completo de las provincias de Álava y Vizcaya, mientras que en Guipúzcoa el número de ejemplares se redujo hasta rondar la centena. Sólo en Navarra se conservó una cabaña relativamente importante, concentrada en su mayor parte en el Valle de Aézcoa.

Esta alarmante situación hizo que la Diputación Foral de Navarra promoviera varias actuaciones con la intención de evitar la extinción de la raza, entre ellas paradas de sementales, centros de selección o concursos. La creación por parte del Ministerio de Agricultura en 1974 del Centro Nacional de Selección y Reproducción Animal de Movera (Zaragoza) también será altamente beneficiosa para la recuperación de la raza (Mendizábal, Ibarbia y Etxaniz, 2005).

En la figura 26 puede apreciarse la evolución que esta raza ha ido sufriendo a lo largo del tiempo.



Figura 26. Evolución morfológica de la raza Pirenaica (Aranguren, 2002)

Es digna de mención la labor desarrollada por el veterinario Teófilo Echeverría Benzunegui, principal responsable del resurgir de la raza bovina Pirenaica.

2.3.2. SITUACIÓN ACTUAL

Mucho han cambiado las cosas en los últimos cincuenta años. De estar al borde de la desaparición ha pasado a convertirse en una raza muy valorada por su aptitud cárnica, estando amparada por la Indicación Geográfica Protegida “Ternera de Navarra – Nafarroako aratxea” (Figura 27), suponiendo el 90 % de la carne comercializada bajo

esa marca de calidad. El 10 % restante procede de las razas Pardo Alpina, Blonde de Aquitania y Charolais y de los cruces entre las cuatro razas autorizadas (MAGRAMA, 2013).



Figura 27. Logotipo de la IGP Ternera de Navarra (www.terneradenavarra.es)

La Confederación de Asociaciones de Ganado Vacuno Pirenaico (CONASPI) es la institución encargada de gestionar el libro genealógico, además de desarrollar actividades que tengan como objetivo la conservación de la raza y su promoción (mejora genética, participación en ferias, cursos de formación...)(CONASPI, 2013).

CONASPI está formada por siete asociaciones: ASPINA (Navarra), ASGAPIR (Vizcaya), ASAPI (Aragón), ASPIC (Cataluña), HEBE (Guipúzcoa), ARPIEL (Álava) y ASPICAN (Cantabria) (Aranguren, 2002).

De acuerdo con los datos proporcionados por CONASPI en su Informe y memoria de 2012, a 31 de diciembre de ese año había inscritos en el libro genealógico 38.780 ejemplares: 5.103 machos y 33.677 hembras (Tabla 5).

	MACHOS	HEMBRAS < 2 AÑOS	HEMBRAS > 2 AÑOS	TOTAL
Guipúzcoa	644	904	1.771	3.319
Vizcaya	524	922	1.972	3.418
Álava	450	913	2.578	3.941
Cantabria	308	865	2.572	3.745
Aragón	456	678	1.949	3.083
Cataluña	27	150	815	992
Navarra	2.694	3.761	13.827	20.282
CONASPI	5.103	8.193	25.484	38.780

Tabla 5. Censo de ganado Pirenaico

Como puede apreciarse en la figura 28, la Comunidad Foral de Navarra cuenta con la cabaña más numerosa (20.282 individuos, más de la mitad de los animales registrados

en el libro genealógico), seguida por el País Vasco, con 10.678 ejemplares; es decir, casi el 28 % de los animales inscritos (CONASPI, 2013).

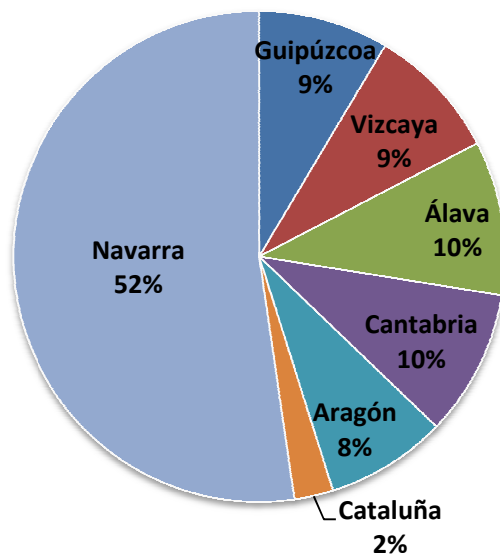


Figura 28. Distribución del ganado de raza Pirenaica en España

2.3.3. CARACTERÍSTICAS DE LA RAZA

Francisco Javier Aranguren Garde, en el libro “La raza Pirenaica” (2002), detalla el estándar racial del ganado Pirenaico:

- Cabeza de medianas proporciones, con encornadura hacia delante, de sección circular en su nacimiento, en lira y ligeramente en espiral.
- Perfil frontonasal subcóncavo, ojos salientes, cara más bien corta, hocico ancho y maxilares robustos.
- Cuello musculado, bien unido a la cabeza y al tronco, de línea superior recta e inferior con papada, como vestigio y prueba de la primitividad de la raza.
- Línea dorsolumbar recta, nacimiento alto de la cola (encallado), costillar arqueado, grupa larga y horizontal y algo angulosa, muslos y nalgas muy desarrollados y descendidos. El vientre es proporcional, como corresponde a una animal andariego que se alimenta con pasto fino.
- Esqueleto fino, compacto. Aplomos correctos. Pezuñas bien desarrolladas y puestas, duras y resistentes.
- Capa monocolor: trigueña más o menos clara “GORRI” o “ZURI”, con aureola alrededor de los ojos (ojo de perdiz), axilas, bragadas y hocicos sin pelos de otro color.
- Mucosas de color carne sonrosadas.

- Cuernos de color blanco nacarado, con las puntas color amarillento y pezuñas de color claro “con visos de color amarillento”.
- Ubre bien formada en tamaño, separación, inserción y longitud de los pezones, y desde luego sin los “pelos largos de lobo” de la primitiva raza vasca.

El bovino Pirenaico (Figura 29), antaño considerado como de triple aptitud (útil para el trabajo, la producción de carne y la producción de leche) en la actualidad, y gracias a los planes de mejora, destaca por su buena aptitud cárnica (Aranguren, 2002).

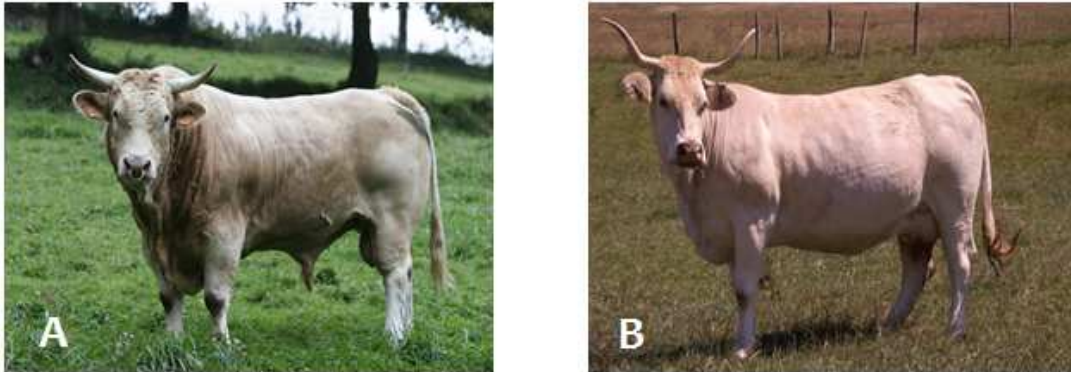


Figura 29. Ejemplares macho (A) y hembra (B) de raza Pirenaica (www.conaspi.es)

OBJETIVOS Y PLANTEAMIENTO EXPERIMENTAL

3. OBJETIVOS Y PLANTEAMIENTO EXPERIMENTAL

El objetivo de este Trabajo Final de Carrera es el estudio del metabolismo del tejido adiposo de terneros de raza Pirenaica durante su crecimiento y cebo. Concretamente, se pretende determinar si la actividad de las enzimas lipogénicas, es decir, aquellas relacionadas con la síntesis de ácidos grasos y glicerol-3-fosfato, varía en función de la edad del animal y de la concentración energética de su dieta.

Las enzimas objeto de estudio han sido la glicerol 3 fosfato deshidrogenasa (G3PDH), la sintetasa de ácidos grasos (FAS), la isocitrato deshidrogenasa (ICDH) y la glucosa 6 fosfato deshidrogenasa (G6PDH).

Las muestras de tejido adiposo se extrajeron de los depósitos subcutáneo e intramuscular, con la intención de encontrar posibles diferencias en los niveles de actividad enzimática entre ambos depósitos, de diferente desarrollo y funcionalidad.

Para llevar a cabo este trabajo se utilizaron 16 terneros machos de raza Pirenaica obtenidos mediante los cruzamientos representados en la figura 30. Todos ellos eran hijos de 16 vacas medio hermanas entre sí y del mismo toro, lo que permitió disponer de animales con un alto grado de parentesco. Que el parentesco entre los terneros sea elevado es muy importante a la hora de desarrollar este tipo de estudios, ya que se reduce la variabilidad intragrupos.

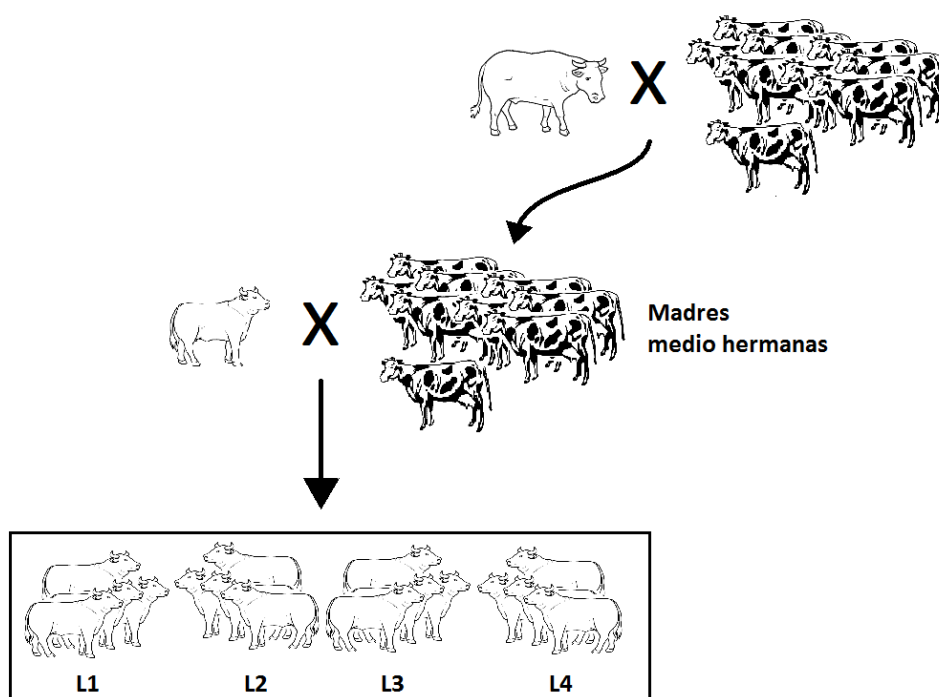


Figura 30. Esquema de selección de los terneros (adaptado de Pascual, 2011)

Los animales fueron agrupados en cuatro lotes de la siguiente manera:

- Lote 1: terneros sacrificados a los 6 meses de edad y alimentados con leche materna, aunque a partir de los 4 meses también recibieron pienso convencional.
- Lote 2: terneros sacrificados a los 12 meses de edad y alimentados con pienso convencional desde los cuatro meses (al principio junto con leche materna y a partir de los seis meses, en exclusiva).
- Lote 3: terneros sacrificados a los 18 meses de edad y alimentados con un pienso rico en energía a partir de los doce meses. Hasta ese momento, su dieta fue la misma que la de los animales del L2.
- Lote 4: terneros sacrificados a los 18 meses de edad y alimentados con un pienso de menor riqueza energética que el del L3 a partir de los doce meses. Hasta ese momento, su dieta fue la misma que la de los animales del L2.

MATERIAL

Y

MÉTODOS

4. MATERIAL Y MÉTODOS

4.1. MATERIAL ANIMAL Y DIETAS

4.1.1. ESTABLECIMIENTO DE LOTES

Los animales de los que procedían las muestras de grasa estudiadas pertenecen a la raza vacuna Pirenaica. Los terneros, en concreto 16 machos con un elevado grado de parentesco, procedían de la granja que Jesús M^a Zabaleta posee en la localidad navarra de Aibar (Figura 31).



Figura 31. Localización de Aibar en Navarra (adaptado de SITNA, 2013)

Para poder estudiar los efectos que la edad y la concentración energética de la ración pudieran tener sobre la actividad de las enzimas lipogénicas (tanto en el depósito subcutáneo como en el intramuscular) los animales se agruparon en lotes de la manera descrita en la tabla 6.

LOTE	EDAD SACRIFICIO	ALIMENTACIÓN
L 1	6 meses	Leche materna (0-6 meses) Pienso convencional (4-6 meses)
L 2	12 meses	Leche materna (0-6 meses) Pienso convencional (4-12 meses)
L 3	18 meses	Leche materna (0-6 meses) Pienso convencional (4-12 meses) Pienso rico en energía (12-18 meses)
L 4	18 meses	Leche materna (0-6 meses) Pienso convencional (4-12 meses) Pienso con menos energía (12-18 meses)

Tabla 6. Diseño de los cuatro lotes de terneros

Durante los seis primeros meses de vida, todos los terneros estuvieron junto a su madre y se alimentaron fundamentalmente con leche materna (Figura 32). Una vez destetados, los animales del lote L1 fueron sacrificados, mientras que el resto fue trasladado a la zona de cebo, donde los terneros tuvieron a su disposición un pienso concentrado convencional hasta cumplir 12 meses. A esa edad, los individuos del lote L2 fueron llevados a matadero y los lotes L3 y L4 vieron modificada su dieta: hasta cumplir 18 meses, los terneros del lote L3 fueron alimentados con un pienso rico en energía, al contrario que los ejemplares del lote L4, que recibieron un pienso con una menor concentración energética. Ambas raciones fueron formuladas y elaboradas por la empresa “Pienso San Cristóbal” de Berriozar (Navarra).



Figura 32. Los terneros en la explotación de Aibar

Los lotes L1, L2 y L3 sirvieron para estudiar la influencia de la edad sobre la actividad enzimática, mientras que para valorar los efectos que sobre esas mismas enzimas pudiera tener la concentración energética del alimento se analizaron las muestras procedentes de los lotes L3 y L4.

4.1.2. DIETAS

A continuación se detallan las características de los piensos suministrados a los animales sacrificados con 18 meses de edad. Es importante destacar que todos los terneros tuvieron acceso ad libitum al agua y al alimento a lo largo de toda su vida.

4.1.2.1. Pienso con alta energía metabolizable

Los cuatro terneros integrantes del lote 3 recibieron una ración con una elevada concentración energética (2.916,85 Kcal EM/kg). Los ingredientes de la misma se detallan en la tabla 7.

MATERIA PRIMA	%
Cebada 2 carreras	16,9
Maíz francés	60,0
Hna. soja 44	16,0
Ac. palma	4,0
Carbonato cálcico	0,9
Fosfato bicálcico	0,2
Sal (terrest)	0,5
Corrector tern-0,4%	1,5

Tabla 7. Ingredientes del pienso con alta energía metabolizable

Este pienso presenta la composición química que se detalla en la tabla 8.

EM RUMEN	kcal/kg	2.916,85
UFL	UFL/kg	1,08
UFC	UFC/kg	1,09
ENL	kcal/kg	1.778,88
PD RUMEN	% ALIM	11,08
PDIE	% ALIM	10,88
PDIN	% ALIM	9,96
PB SOLUBLE	% ALIM	2,56

Tabla 8. Análisis químico del pienso con alta energía metabolizable

4.1.2.2. Pienso con baja energía metabolizable

En la tabla 9 aparecen los ingredientes de la ración suministrada a los animales del lote 4 a partir de los 12 meses, es decir, un pienso con una concentración energética no tan elevada (2.632,95 Kcal EM/kg).

MATERIA PRIMA	%
Cebada 2 carreras	13,9
Maíz francés	55,0
Hna. soja 44	16,0
Paja de cereales	11,0
Ac. palma	1,0
Carbonato cálcico	0,9
Fosfato bicálcico	0,2
Sal (terrest)	0,5
Corrector tern-0,4%	1,5

Tabla 9. Ingredientes del pienso con baja energía metabolizable

La composición de este pienso se muestra en la tabla 10.

EM RUMEN	kcal/kg	2.632,95
UFL	UFL/kg	0,96
UFC	UFC/kg	0,96
ENL	kcal/kg	1.568,66
PD RUMEN	% ALIM	10,63
PDIE	% ALIM	10,55
PDIN	% ALIM	9,66
PB SOLUBLE	% ALIM	2,49

Tabla 10. Análisis químico del pienso con baja energía metabolizable

4.1.3. CARACTERÍSTICAS PRODUCTIVAS

La información sobre las características productivas de los terneros cuyas muestras de grasa han servido para la realización de este trabajo procede del estudio llevado a cabo por Pascual (2011).

En la tabla 11 aparecen recogidos los datos relativos al peso de los animales en el momento de ser sacrificados así como la ganancia media diaria de cada uno de los lotes establecidos. Este último dato se ha calculado teniendo en cuenta un peso vivo al nacimiento de 42 kg (Pascual, 2011).

	LOTES				E. E. MEDIO	SIGNIFIC P
	6 MESES	12 MESES	18 MESES A	18 MESES B		
Edad sacrificio	176 días ^(a)	374 días ^(b)	548 días ^(c)	557 días ^(c)	8,99	0,0001
Peso sacrificio	335 kg ^(a)	585 kg ^(b)	813 kg ^(c)	784 kg ^(c)	10,81	0,01
GMD (kg/día)	1,65 ^(a)	1,44 ^(b)	1,40 ^(b)	1,33 ^(b)	0,033	0,002

*Letras iguales o ausencia de letras: P > 0,05; letras diferentes: P < 0,05.

A: 2.916,85 Kcal EM/kg y B: 2.632,95 Kcal EM/kg

Tabla 11. Evolución de los parámetros productivos de los terneros (Pascual, 2011)

En las gráficas siguientes puede apreciarse la evolución sufrida tanto por el peso (Figura 33) como por la ganancia media diaria (Figura 34) a lo largo de la vida de los terneros.

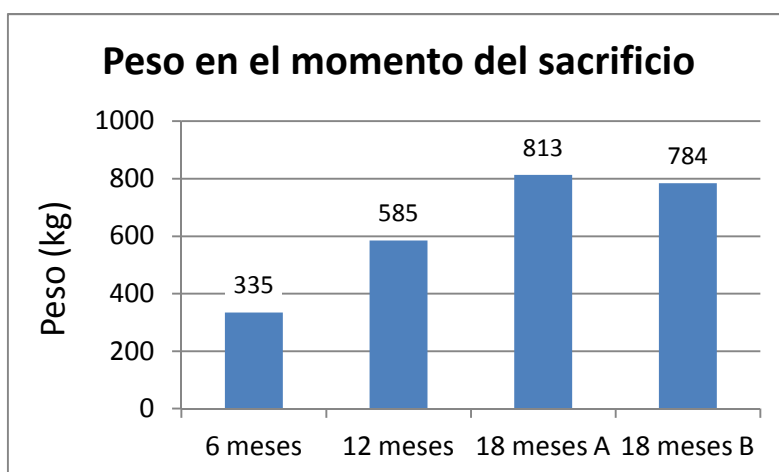


Figura 33. Peso medio de los animales en el momento del sacrificio

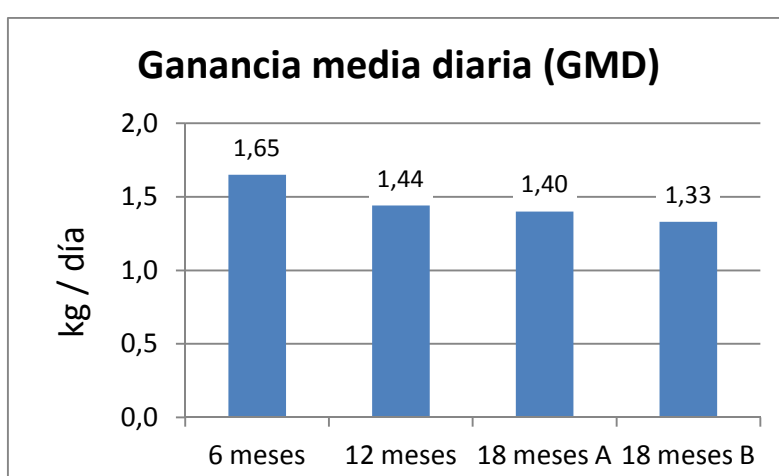


Figura 34. Ganancia media diaria (kg/día) de cada lote

Pascual (2011) también analizó las posibles diferencias que pudiera haber entre los animales de los lotes 3 y 4. Los integrantes del lote 3 recibieron una ración con alta energía metabolizable, al contrario que los terneros del lote 4, cuya dieta era pobre en energía. El estudio de la ganancia media diaria y del peso vivo de los ocho animales implicados arrojó los datos que aparecen en la tabla 12.

	LOTES		EE MEDIO	SIGNIFIC. P
	ALTA	BAJA		
PV 12 meses (kg)	588	582	18,09	0,78
PV 15 meses (kg)	738	741	18,09	0,92
PV 18 meses (kg)	813	784	15,85	0,25
GMD 12-15 meses (kg / día)	1,25	1,32	0,084	0,44
GMD 15-18 meses (kg / día)	1,25	0,72	0,121	0,12
GMD 12-18 meses (kg / día)	1,25	1,12	0,075	0,30

Tabla 12. Evolución del crecimiento de los terneros entre los 12 y los 18 meses (Pascual, 2011)

4.2. SACRIFICIO Y TOMA DE MUESTRAS

El sacrificio de los animales se efectuó en el matadero de Pamplona “La Protectora” lugar al que fueron trasladados los terneros desde la explotación de Aibar una vez pesados y cuidando que las condiciones del viaje fueran lo más adecuadas posible.

Tras el sacrificio, de cada ternero se obtuvieron 2 muestras: una del depósito subcutáneo y otra del intramuscular (Figura 35). Las del depósito subcutáneo se extrajeron en la región dorsal izquierda, a la altura de la 10ª costilla, mientras que la grasa intramuscular se tomó del músculo *Longissimus dorsi*, también en la zona de la 10ª costilla.

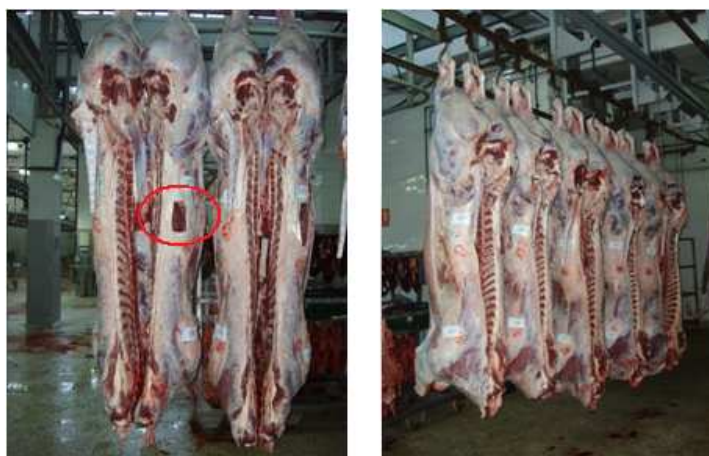


Figura 35. Canales y zona en la que se extrajeron las muestras

Hasta la llegada de las muestras al laboratorio del Departamento de Producción Animal de la UPNA en el que iban a ser conservadas a -80°C , estas se mantuvieron en nitrógeno líquido a -196°C .

Además de las muestras con las que se iba medir la actividad enzimática (es decir, las que han servido para la elaboración del presente trabajo) también se tomaron otras con la intención de determinar el tamaño de los adipocitos presentes en cada depósito. Cada una de estas muestras (obtenidas de las mismas regiones que las anteriores) contaba con un peso de unos 15 g.

En este caso, la conservación de las muestras hasta su llegada al Edificio de los Olivos de la UPNA y su consiguiente congelación, se realizó en tubos que contenían 10 ml de solución Tirode (0,15M NaCl; 6mM KCl; 2mM NaHCO₃; pH 7,62) mantenidos a una temperatura de 39°C gracias a la utilización de termos.

El número y el volumen de los adipocitos fueron estudiados por Pascual (2011), y tal y como se refleja más adelante, sus resultados han sido necesarios para poder calcular los niveles de actividad de las enzimas estudiadas en el presente trabajo.

4.3. TAMAÑO Y NÚMERO DE LOS ADIPOCITOS

Como ya se ha señalado en ocasiones anteriores, Pascual (2011) se encargó de estudiar algunos aspectos del desarrollo del tejido adiposo en los mismos terneros que han servido para la elaboración de este trabajo, siendo uno de sus objetivos la determinación del tamaño y número de los adipocitos presentes en los depósitos subcutáneo e intramuscular de dichos animales.

La metodología seguida por Pascual (2011) con el fin de determinar el número y el tamaño de las células adiposas (y que se describe a continuación) fue la digestión con colagenasa (Robdell, 1964 y modificada por Robertson y cols., 1982). El interés del uso de colagenasa reside en que gracias a ella se digiere el tejido conjuntivo que rodea a los adipocitos, de modo que estos pueden observarse libres.

La solución usada para digerir la colagenasa que rodea a los adipocitos constaba de 5 ml de medio 199 comercial, 200 mg de seroalbúmina bovina y 5 (depósito subcutáneo) ó 10 (depósito intramuscular) mg de colagenasa tipo II; ajustándose el pH entre 7 y 7,4. Con el objeto de que la superficie de ataque de la colagenasa fuese la mayor posible, las muestras fueron desmenuzadas antes de ser introducidas en matraces con la solución anteriormente descrita, y ahí se mantuvieron durante 90 minutos a una temperatura de 39°C (temperatura fisiológica de la especie bovina).

El filtrado obtenido fue observado al microscopio y mediante un equipo de Análisis de Imagen fueron tomadas las fotografías que permitieron calcular el tamaño de los adipocitos (Figura 36).

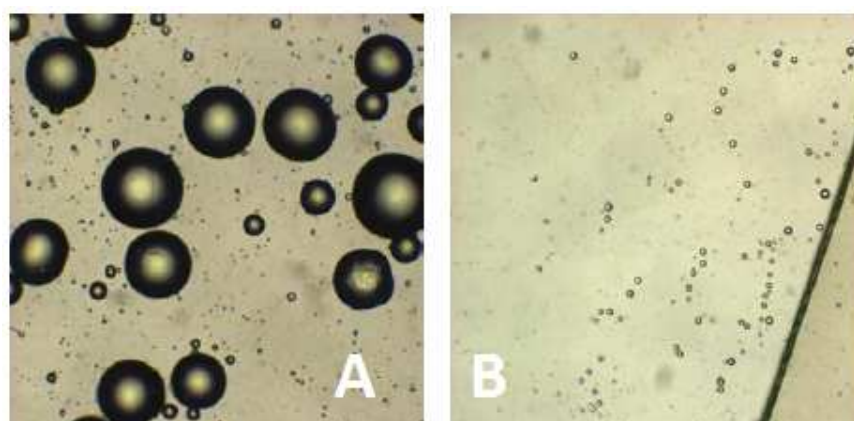


Figura 36. Imágenes al microscopio (x300) de adipocitos de los depósitos subcutáneo (A) e intramuscular (B)

Posteriormente, y gracias al programa informático Image-Pro Plus 5.1 que sirvió para determinar el diámetro equivalente, se calculó el diámetro de los adipocitos (unos 200 por depósito en cada animal) (Tabla 13).

DEPÓSITO	LOTES				E E MEDIO	SIGNIFIC P
	6 MESES	12 MESES	18 MESES A	18 MESES B		
SC pequeños	30,87	32,24	35,34	37,54	1,94	0,0859
SC grandes	147,53	173	154,91	161,98	6,66	0,0646
IM	20,589	16,542	22,205	15,915	2,35	0,3681

Tabla 13. Diámetro medio (μm) de los adipocitos

4.4. ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA

La actividad de cada una de las enzimas estudiadas se determinó mediante espectrofotometría, siguiendo los pasos que se detallan a continuación.

4.4.1. HOMOGENEIZACIÓN DE LAS MUESTRAS

Para poder determinar los niveles de actividad de las diferentes enzimas estudiadas (la glicerol 3 fosfato deshidrogenasa, la sintetasa de ácidos grasos, la isocitrato deshidrogenasa y la glucosa 6 fosfato deshidrogenasa) es preciso que las muestras de grasa sean previamente homogeneizadas. Con la finalidad de evitar que dichas muestras sufran alteraciones, es muy importante seguir las siguientes recomendaciones:

- Todos los pasos descritos a continuación deben llevarse a cabo a baja temperatura con el objetivo de prevenir la desnaturalización de las enzimas, por lo que será necesario el uso de hielo.
- Después de cada uso, los instrumentos deben limpiarse a fondo para evitar distorsiones en los resultados finales. Las pinzas, los bisturís, los filtros de tela y de red y demás material deben estar libres de restos de tejido antes de volver a ser utilizados.

El proceso de homogenización consiste en triturar al máximo una pequeña porción de cada muestra (entre 0,7 y 0,8 g de la misma) mezclada con una solución (tampón STEG), todo ello a baja temperatura para evitar la desnaturalización de las enzimas. El producto resultante es sometido a 3 filtraciones sucesivas para obtener el extracto homogeneizado, que debe conservarse a -80°C hasta el momento de su uso.

El procedimiento detallado es el siguiente:

1. Desmenuzar con ayuda de un bisturí un pedazo de la muestra (congelada a 80°C bajo cero)
2. Pesar entre 0,7 y 0,8 gramos de la muestra triturada.
3. Anadir 4 ml de tampón STEG*.
4. Homogeneizar la mezcla con el ULTRA-TURRAX durante 30 segundos a 24.000 rpm. Este paso debe repetirse 2 veces más.
5. Filtrar con un filtro de tela el producto obtenido.
6. Centrifugar el filtrado a 6.000 rpm durante 10 minutos a 4°C .
7. Filtrar con un filtro de red.
8. Centrifugar el producto a 12.000 rpm durante 20 minutos a 4°C .
9. Filtrar a través de un filtro de papel Whatman ($0,45\ \mu\text{m}$ de poro) utilizando para ello una jeringuilla.
10. Dividir el filtrado en tubos eppendorf de 1,5 ml.
11. Almacenar en el congelador a -80°C .

*Para elaborar el tampón STEG (pH = 7,4) se necesitan:

- Sacarosa (0,3 M): 102,69 g/l
- Trizna base (30 mM): 3,63 g/l
- EDTA (1mM): 037 g/l
- Glutati3n forma reducida (1mM): 0,307 g/l

La cantidad de tejido triturado, así como el volumen de extracto obtenido se detalla en las tablas 14 y 15.

Lote	Individuo	Fecha extracción	Gramos tejido	Volumen extracto (ml)
6 MESES	T1	3 - X - 12	0,7692	2,5
	T2	"	0,7940	2,5
	T3	"	0,7362	1,8
	T4	"	0,7278	2,4
12 MESES	T1	4 - X - 12	0,7218	2,4
	T2	"	0,7681	2,3
	T3	"	0,7662	2,7
	T4	"	0,7620	2,1
18 MESES ALTA ENERGÍA	A1	8 - X - 12	0,7480	2,5
	A2	"	0,7437	2,5
	A3	"	0,7776	1,8
	A4	"	0,7122	2,5
18 MESES BAJA ENERGÍA	B1	9 - X - 12	0,7515	1,5
	B2	"	0,7371	2,5
	B3	"	0,7811	1,8
	B4	"	0,7960	2,6

Tabla 14. Homogenización de las muestras de grasa del depósito subcutáneo

Lote	Individuo	Fecha extracción	Gramos tejido	Volumen extracto (ml)
6 MESES	T1	16 - X - 12	0,7650	2
	T2	"	0,7736	1,4
	T3	"	0,7901	0,5
	T4	"	0,7919	-
12 MESES	T1	15 - X - 12	0,7532	1,2
	T2	"	0,7794	1,8
	T3	"	0,7273	2,5
	T4	"	0,7712	1,5
18 MESES ALTA ENERGÍA	A1	11 - X - 12	0,7479	1,2
	A2	"	0,7850	1,6
	A3	"	0,7733	1,5
	A4	"	0,7119	0,7
18 MESES BAJA ENERGÍA	B1	10 - X - 12	0,7755	1,5
	B2	"	0,7473	1,7
	B3	"	0,7875	1,5
	B4	"	0,7664	1,4

Tabla 15. Homogenización de las muestras de grasa del depósito intramuscular

4.4.2. MEDIDA DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA

Tras haber homogeneizado la totalidad de las muestras se procedió a la medición de la actividad enzimática mediante espectrofotometría. Para ello se utilizó un espectrofotómetro de doble haz, el SPECORD 205 de la casa ANALYTIK JENA, junto con el programa informático winASPECT (Figura 37).



Figura 37. Espectrofotómetro empleado en las mediciones (Montes, 2012)

Un espectrofotómetro es un instrumento que permite medir la radiación absorbida por una disolución cuando ésta se ve atravesada por un haz de luz (Figura 38). De acuerdo con la ley de Beer, cuanto mayor es la concentración de un determinado soluto en la disolución, mayor es también el valor de la absorbancia. En este caso, tal y como señala el procedimiento recomendado por Soret *et al.* (1998), se hizo incidir sobre las muestras luz ultravioleta con una longitud de onda de 340 nm durante 3 minutos.

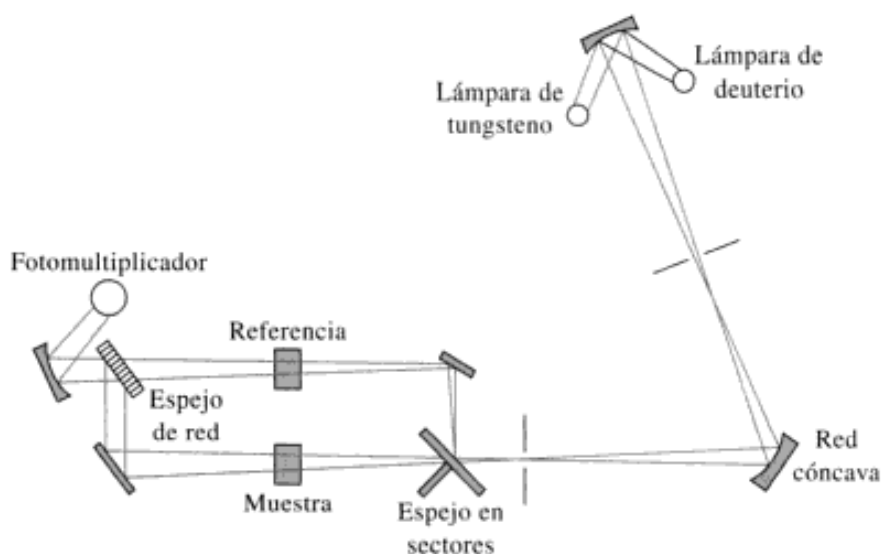


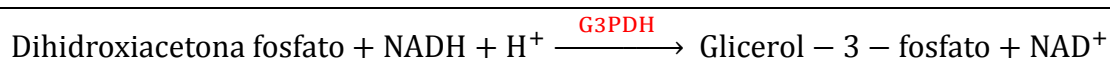
Figura 38. Esquema del funcionamiento de un espectrofotómetro de doble haz (Skoog, Holler y Crouch, 2008)

Antes de pasar a describir el procedimiento que debe seguirse para medir la actividad de cada una de las enzimas estudiadas es muy importante tener en cuenta las siguientes advertencias:

- Las muestras previamente homogeneizadas y conservadas a -80°C deben descongelarse lentamente, introducidas en hielo.
- Como la reacción comienza en el mismo instante en que se mezclan todos los sustratos, debe actuarse con rapidez para colocar las cubetas en el espectrofotómetro en el menor tiempo posible.

4.4.2.1. Actividad de la enzima G3PDH

El espectrofotómetro mide el consumo de NADH:



Procedimiento (adaptado de Wise y Green, 1979)

1. Calentar el tampón* a 37°C , tomar $275\ \mu\text{m}$ y añadirlos a la cubeta.
2. Añadir a la cubeta, por este orden:
 - $10\ \mu\text{l}$ de NADH ($0,215\ \text{mM}$)
 - $5\ \mu\text{l}$ de muestra
 - $10\ \mu\text{l}$ de Dihidroxiacetona fosfato (DHAP; $1,2\ \text{mM}$).

En el caso del control, se añadirá H_2O desionizada en lugar de DHAP.
3. Agitar la cubeta (invirtiéndola).
4. Medir la reacción durante 3 minutos con luz ultravioleta a $340\ \text{nm}$.

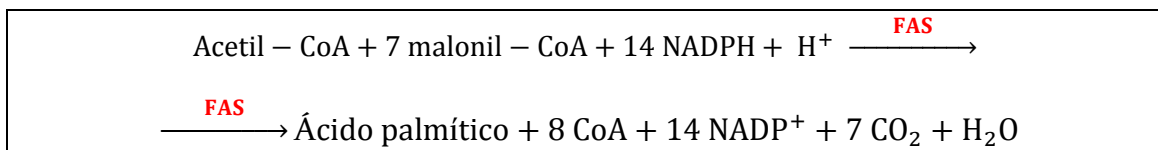
Durante el tiempo que la cubeta se ve atravesada por la radiación ultravioleta, el programa informático registra las variaciones de absorbancia producidas como consecuencia del consumo de NADH. Una vez concluida la medición, el ordenador proporciona la variación de absorbancia por minuto; dato a partir del que se calculará la actividad de la enzima G3PDH.

*Para elaborar el tampón ($\text{pH} = 7,5$) se necesitan:

- Trietanolamina ($100\ \text{mM}$): $13,34\ \text{g/l}$
- EDTA ($3\ \text{mM}$): $1,12\ \text{g/l}$

4.4.2.2. Actividad de la enzima FAS

El espectrofotómetro mide el consumo de NADPH:



Procedimiento (adaptado de Halestrap y Denton, 1973)

1. Calentar el tampón* a 37 °C, tomar 262 µm y añadirlos a la cubeta.
2. Añadir a la cubeta, por este orden:
 - 10 µl de Acetil CoA (0,05 mM)
 - 10 µl de NADPH (0,15 mM)
 - 8 µl de muestra
 - 10 µl de Malonil CoA (0,1 mM)

En el caso del control, se añadirá H₂O desionizada en lugar de Malonil CoA.
3. Agitar la cubeta (invirtiéndola).
4. Medir la reacción durante 3 minutos con luz ultravioleta a 340 nm.

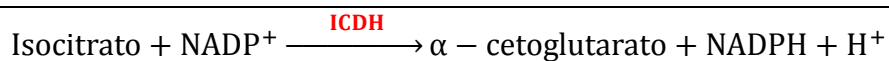
Durante el tiempo que la cubeta se ve atravesada por la radiación ultravioleta, el programa informático registra las variaciones de absorbancia producidas como consecuencia del consumo de NADPH. Una vez concluida la medición, el ordenador proporciona la variación de absorbancia por minuto; dato a partir del que se calculará la actividad de la enzima FAS.

*Para elaborar el tampón (pH =6,8) se necesitan:

- Fosfato potasico (100 mM): 22,82 g/l
- EDTA (1 mM): 0,3722 g/l
- Ditioneitol (DTT; 1 mM): 0,154 g/l

4.4.2.3. Actividad de la enzima ICDH

El espectrofotómetro mide la producción de NADPH:



Procedimiento (adaptado de Plaut, 1962)

1. Calentar el tampón* a 37 °C, tomar 250 µm y añadirlos a la cubeta.
2. Añadir a la cubeta, por este orden:
 - 25 µl de Cloruro de manganeso (30 mM)
 - 50 µl de EDTA (3,4 mM)
 - 5 µl de NADP (15 mM)
 - 10 µl de muestra
 - 5 µl de Isocitrato (15 mM)

En el caso del control, se añadirá H₂O desionizada en lugar de Isocitrato.
3. Agitar la cubeta (invirtiéndola).
4. Medir la reacción durante 3 minutos con luz ultravioleta a 340 nm.

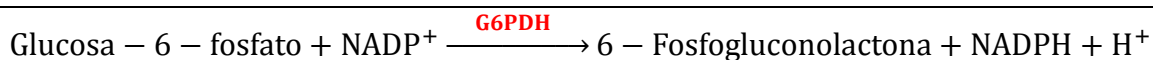
Durante el tiempo que la cubeta se ve atravesada por la radiación ultravioleta, el programa informático registra las variaciones de absorbancia debidas a la producción de NADPH. Una vez concluida la medición, el ordenador proporciona la variación de absorbancia por minuto; dato a partir del que se calculará la actividad de la enzima ICDH.

*Para elaborar el tampón (pH =7,4) se necesita:

- TRIS (50 mM): 6,04 g/l

4.4.2.4. Actividad de la enzima G6PDH

El espectrofotómetro mide la producción de NADPH:



Procedimiento (adaptado de Glock y McLean, 1953)

1. Calentar el tampón* a 37 °C, tomar 274 µm y añadirlos a la cubeta.
2. Añadir a la cubeta, por este orden:
 - 10 µl de NADP (0,2 mM)
 - 6 µl de muestra
 - 10 µl de Glucosa 6 fosfato (G6P; 0,2 mM)

En el caso del control, se añadirá H₂O desionizada en lugar de Glucosa 6 fosfato.
3. Agitar la cubeta (invirtiéndola).
4. Medir la reacción durante 3 minutos con luz ultravioleta a 340 nm.

Durante el tiempo que la cubeta se ve atravesada por la radiación ultravioleta, el programa informático registra las variaciones de absorbancia debidas a la producción de NADPH. Una vez concluida la medición, el ordenador proporciona la variación de absorbancia por minuto; dato a partir del que se calculará la actividad de la enzima G6PDH.

*Para elaborar el tampón (pH =7,6) se necesita:

- Glicilglicina (0,1 M): 13,21 g/l
- Cloruro magnesico (10 mM): 2,022 g/l

4.4.3. CÁLCULOS MATEMÁTICOS

En este apartado se explican los pasos que hay que seguir para calcular, a partir del dato de variación de absorbancia por minuto, los niveles de actividad enzimática.

1. Según la Ley de Beer – Lambert – Bouguer, la fórmula de la absorbancia es la siguiente:

$$A = \epsilon \times b \times c$$

A: absorbancia
 ϵ : coeficiente de extinción molar del NADPH y del NADH
b: distancia atravesada por la radiación

En este caso,

$$- \epsilon = 6,2 \frac{l}{mmol \cdot cm}$$

$$- b = 1 \text{ cm}$$

Por lo tanto, la concentración (c) será

$$c = \frac{A}{\epsilon \cdot b} \text{ (milimol/litro)} \longrightarrow c = \frac{A}{6,2} \text{ milimol/litro}$$

2. Una vez conocida la concentración, puede calcularse la cantidad de milimoles (producidos o consumidos, depende de la enzima de que se trate) en dicha cubeta. Para ello debe operarse de la siguiente manera:

$$X = \frac{A \cdot V_C}{6,2 \cdot 10^3}$$

X: nº de milimoles en la cubeta
A: absorbancia
 V_C : volumen de líquido en la cubeta (ml)

3. Mediante una simple regla de tres podemos calcular el número de milimoles correspondiente a toda la muestra homogeneizada:

$$X = \frac{A \cdot V_C \cdot V_{STEG}}{6,2 \cdot 10^3 \cdot V_{muestra}}$$

X: nº de milimoles en los 4 ml de STEG
A: absorbancia
 V_C : volumen de líquido en la cubeta (ml)
 V_{STEG} : volumen de tampón STEG (4 ml)
 $V_{muestra}$: volumen de extracto añadido en la cubeta (ml)

4. Esos milimoles proceden de una muestra con un peso comprendido entre los 0,7 y los 0,8 g. Gracias a este dato, mediante una nueva regla de tres puede determinarse la cantidad de milimoles por gramo de tejido homogeneizado:

$$X = \frac{A \cdot V_C \cdot V_{STEG}}{6,2 \cdot 10^3 \cdot V_{muestra} \cdot T_h}$$

X: nº de milimoles en el tejido homogeneizado
A: absorbancia
V_C: volumen de líquido en la cubeta (ml)
V_{STEG}: volumen de tampón STEG (4 ml)
V_{muestra}: volumen de extracto en la cubeta (ml)
T_h: masa de tejido homogeneizado (g)

Si se multiplica por 10^3 , la actividad enzimática se expresa en nanomoles / (g tejido x minuto):

$$\text{nanomoles}/(\text{gramo tejido} \cdot \text{minuto}) = \frac{A \cdot V_C \cdot V_{STEG}}{6,2 \cdot V_{muestra} \cdot T_h}$$

De esta forma se logra expresar la actividad enzimática por gramo de tejido, pero lo que se pretende es hacerlo por millón de adipocitos.

5. Para poder expresar la actividad por millón de adipocitos es necesario conocer la siguiente información, procedente del estudio llevado a cabo por Pascual (2011):
- Riqueza en lípidos de la grasa (soxhlet)
 - Densidad de la grasa (0,915 g / cm³)
 - Volumen de los adipocitos

Gracias a estos datos puede calcularse la cantidad de células adiposas contenida en un gramo de grasa:

$$n^{\circ} \text{ adipocitos/g tejido graso} = \frac{\text{masa grasa pura} / \text{densidad grasa}}{\text{volumen adipocito}}$$

6. Finalmente, la actividad puede ser expresada en $\frac{\text{nanomoles}}{\text{millón adipocitos} \cdot \text{minuto}}$:

$$\text{Actividad enzimática} = \frac{\text{nanomoles} / \text{g tejido} \cdot \text{minuto}}{n^{\circ} \text{ adipocitos} / \text{g tejido}} \cdot 10^6$$

4.5. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

El tratamiento estadístico de los datos obtenidos en el laboratorio es imprescindible para poder sacar conclusiones acerca de cómo se ve influida la actividad de las enzimas en función del depósito graso, de la edad o de la combinación de ambos factores.

Mediante el programa informático SPSS Statistics 19.0 se ha realizado un análisis de varianza para estudiar el efecto lote, el efecto depósito y el efecto debido a la interacción lote x depósito:

$$X_{ijk} = \mu + L_i + D_j + (L \cdot D)_{ij} + e_{ijk}$$

- X_{ijk} : valores para cada individuo de la actividad enzimática lipogénica.
- μ : media de la población considerada
- L_i : efecto fijo debido al lote
 - ✓ i=1: sacrificados a los 6 meses
 - ✓ i=2: sacrificados a los 12 meses
 - ✓ i=3: sacrificados a los 18 meses y alimentados con pienso rico en energía
 - ✓ i=4: sacrificados a los 18 meses y alimentados con pienso pobre en energía
- D_j : efecto fijo debido al depósito
 - ✓ j=1: subcutáneo
 - ✓ j=2: intramuscular
- $(L \cdot D)_{ij}$: efecto de la interacción lote x depósito graso
- e_{ijk} : error residual aleatorio

Para hacer las comparaciones entre lotes y entre depósitos se realizará el test de Scheffe.

CONDICIONES PARA EL ANÁLISIS DE VARIANZA

Antes de hacer un análisis de varianza se debe comprobar que se cumplen los siguientes requisitos (Quesada, Isidoro y López, 2002):

1. Las poblaciones de donde proceden las muestras deben ser normales; es decir, la variable dependiente debe presentar una distribución normal en las poblaciones.
2. Las poblaciones deben tener la misma varianza (homocedasticidad).
3. Las muestras deben ser elegidas al azar.

En el presente estudio no se cumple la primera de las condiciones. Por este motivo ha sido necesario efectuar una transformación logarítmica de los datos, consistente en sustituir el valor de X por el de logaritmo de X , como paso previo al análisis de varianza.

Los resultados obtenidos se muestran en el siguiente apartado de este trabajo.

RESULTADOS

5. RESULTADOS

Tal y como se ha señalado en el punto anterior, debido a que no se cumplía la condición de normalidad era imprescindible corregir los datos para poder hacer un análisis de varianza correcto, optándose por una transformación logarítmica de los mismos. Por lo tanto, los resultados del análisis de varianza que se muestran en las tablas 14, 15, 16 y 17 han sido generados a partir de los valores de logaritmo de X.

Por su parte, las gráficas de barras que acompañan a cada tabla representan los valores de actividad enzimática X; o lo que es lo mismo, reflejan los niveles de actividad enzimática detectados en el laboratorio, sin ningún tipo de modificación.

4.6. GLICEROL 3 FOSFATO DESHIDROGENASA

Los niveles de significación de los efectos lote, depósito y su interacción, obtenidos tras someter a los datos de actividad de la enzima G3PDH al análisis de varianza descrito en el apartado 4.4 aparecen reflejados en la tabla 14.

	LOTE	DEPÓSITO	L x D	R ²
G3PDH	0,24	<0,001	0,49	0,41
	NS	***	NS	

NS: P > 0,05; ***: P < 0,001

Tabla 16. Niveles de significación de los efectos lote (L), depósito graso (D), lote x depósito (LxD) y el coeficiente de determinación (R²), para la actividad de la enzima lipogénica glicerol 3 fosfato deshidrogenasa (G3PDH).

No se encontraron diferencias significativas atribuibles al efecto lote, puesto que el valor p es superior a 0,05, al igual que el efecto de la interacción lote x depósito, donde el valor p alcanza 0,49.

Por el contrario, el p valor asociado al tipo de depósito graso es inferior a 0,001, lo que indica que la actividad de la enzima G3PDH sí parece verse afectada dependiendo del depósito en que se encuentre. Esto puede apreciarse en la figura 39, que muestra la actividad de la enzima glicerol 3 fosfato deshidrogenasa expresada en nanomoles por millón de adipocitos por minuto. Se aprecia que la actividad de esta enzima en el depósito subcutáneo es superior a la registrada en el intramuscular.

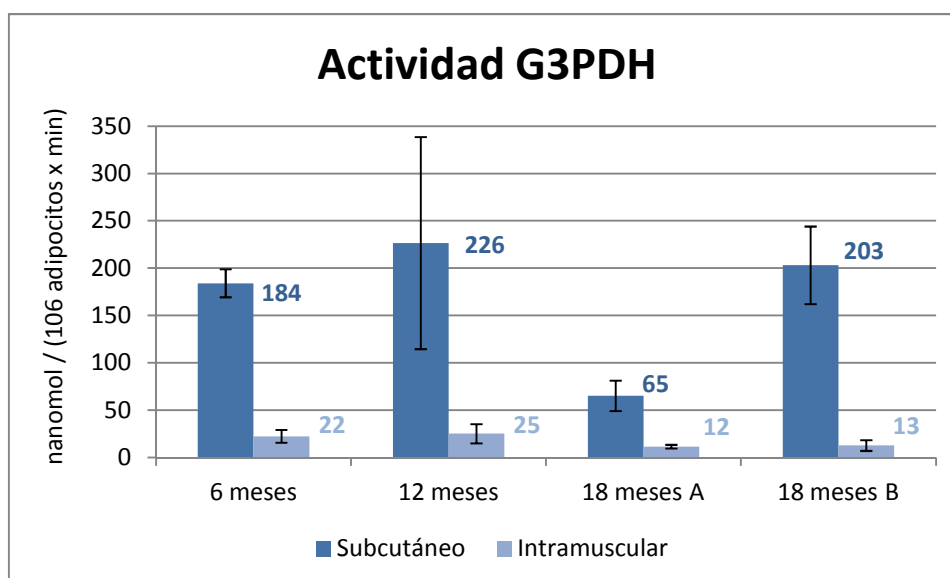


Figura 39. Valores medios de la actividad de la enzima glicerol 3 fosfato deshidrogenasa en los depósitos grasos subcutáneo e intramuscular de cada lote (Lote 1: sacrificio a los 6 meses; lote 2: sacrificio a los 12 meses; lote 3: sacrificio a los 18 meses + ración de alta energía; lote 4: sacrificio a los 18 meses + ración de baja energía).

4.7. SINTETASA DE ÁCIDOS GRASOS

En la tabla 15 aparecen recogidos los niveles de significación de los efectos lote, depósito y la interacción entre ambos relativos a la enzima sintetasa de ácidos grasos.

	LOTE	DEPÓSITO	L x D	R ²
FAS	0,17	<0,001	0,09	0,59
	NS	***	NS	

NS: P > 0,05; ***: P < 0,001

Tabla 17. Niveles de significación de los efectos lote (L), depósito graso (D), lote x depósito (LxD) y el coeficiente de determinación (R²), para la actividad de la enzima lipogénica sintetasa de ácidos grasos (FAS).

El valor p correspondiente al efecto lote (0,17) es superior a 0,05, lo que quiere decir que no parece que la edad influya sobre la actividad de la sintetasa de ácidos grasos. De la misma forma, el efecto de la interacción entre el lote y el depósito tampoco es significativo, con un p valor de 0,09.

En cambio, el nivel de significación del efecto depósito es inferior a 0,001. Es decir, los niveles de actividad enzimática sí que se ven afectados por el tipo de depósito graso,

tal y como refleja la figura 40, donde se muestra la actividad de la enzima sintetasa de ácidos grasos expresada en nanomoles por millón de adipocitos por minuto.

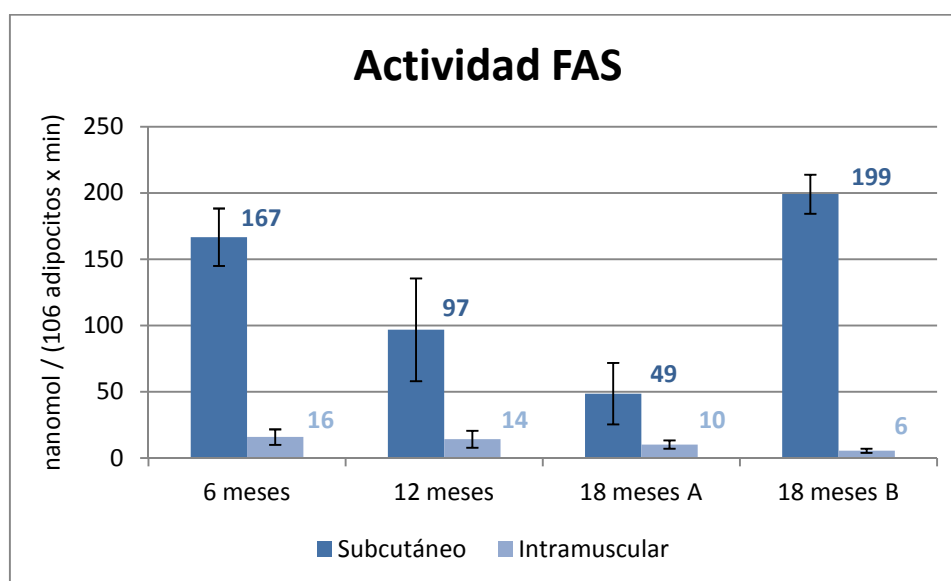


Figura 40. Valores medios de la actividad de la enzima sintetasa de ácidos grasos en los depósitos grasos subcutáneo e intramuscular de cada lote (Lote 1: sacrificio a los 6 meses; lote 2: sacrificio a los 12 meses; lote 3: sacrificio a los 18 meses + ración de alta energía; lote 4: sacrificio a los 18 meses + ración de baja energía).

4.8. ISOCITRATO DESHIDROGENASA

Los niveles de significación de los efectos lote, depósito y la interacción entre ambos, relativos a la actividad de la enzima isocitrato deshidrogenasa, aparecen en la tabla 16.

	LOTE	DEPÓSITO	L x D	R ²
ICDH	0,12	<0,001	0,15	0,38
	NS	***	NS	

NS: P > 0,05; ***: P < 0,001

Tabla 18. Niveles de significación de los efectos lote (L), depósito graso (D), lote x depósito (LxD) y el coeficiente de determinación (R²), para la actividad de la enzima lipogénica isocitrato deshidrogenasa (ICDH).

Al igual que en el caso de las enzimas G3PDH y FAS, en esta ocasión tampoco los efectos lote e interacción lote x depósito presentan significación estadística, mientras que el efecto depósito sí parece ejercer influencia sobre los niveles de actividad de la enzima.

La figura 41 muestra la actividad de la enzima isocitrato deshidrogenasa expresada en nanomoles por millón de adipocitos por minuto.

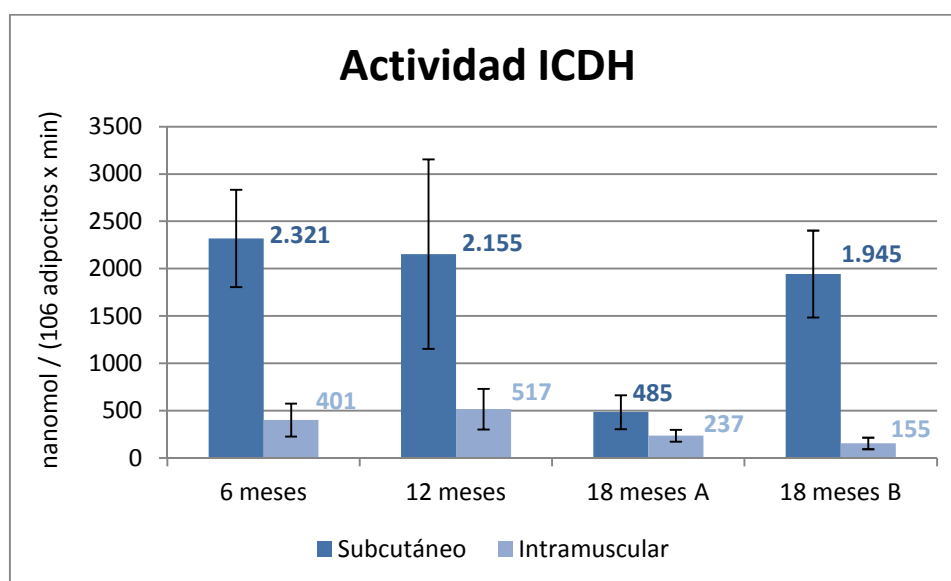


Figura 41. Valores medios de la actividad de la enzima isocitrato deshidrogenasa en los depósitos grasos subcutáneo e intramuscular de cada lote (Lote 1: sacrificio a los 6 meses; lote 2: sacrificio a los 12 meses; lote 3: sacrificio a los 18 meses + ración de alta energía; lote 4: sacrificio a los 18 meses + ración de baja energía).

4.9. GLUCOSA 6 FOSFATO DESHIDROGENASA

La actividad de la enzima G6PDH únicamente pudo cuantificarse en el depósito SC ya que en las cubetas con muestras de depósito IM, por causas no determinadas, no se consiguió detectar variaciones en la absorbancia. Por esta razón, la tabla 17 muestra únicamente los niveles de significación del efecto lote.

	LOTE	R ²
G6PDH	0,13	0,32
	NS	

NS: P > 0,05; ***: P < 0,001

Tabla 19. Nivel de significación del efecto lote (L) y coeficiente de determinación (R²), para la actividad de la enzima lipogénica glucosa 6 fosfato deshidrogenasa (G6PDH).

Del mismo modo que en los casos anteriores, parece que el efecto lote no está relacionado con los niveles de actividad de la enzima glucosa 6 fosfato deshidrogenasa.

La figura 42 muestra la actividad de la enzima glucosa 6 fosfato deshidrogenasa expresada en nanomoles por millón de adipocitos por minuto.

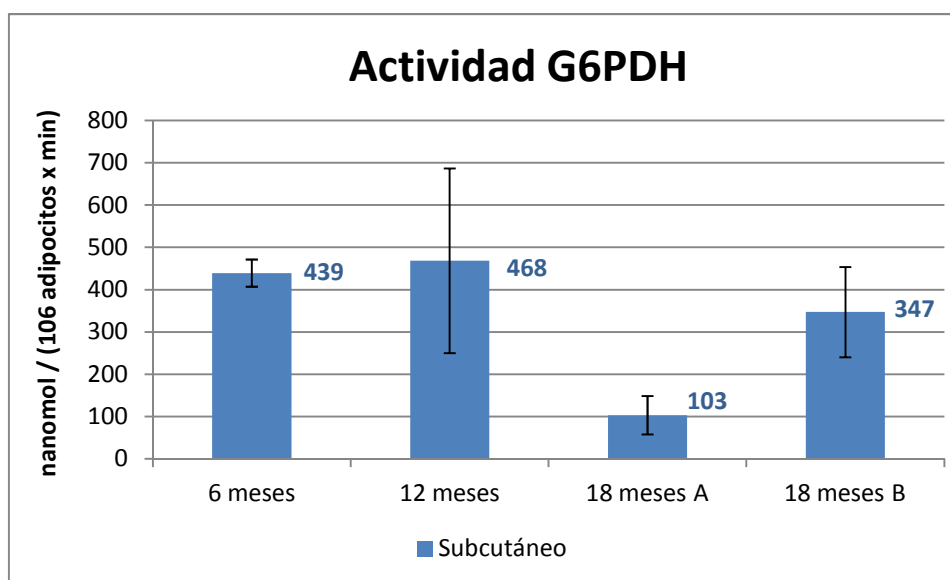


Figura 42. Valores medios de la actividad de la enzima glucosa 6 fosfato deshidrogenasa en el depósito graso subcutáneo de cada lote (Lote 1: sacrificio a los 6 meses; lote 2: sacrificio a los 12 meses; lote 3: sacrificio a los 18 meses + ración de alta energía; lote 4: sacrificio a los 18 meses + ración de baja energía).

DISCUSIÓN

6. DISCUSIÓN

Tal y como podrá comprobarse a lo largo de las siguientes páginas, los valores obtenidos para la actividad de las enzimas lipogénicas estudiadas (glicerol 3 fosfato deshidrogenasa, sintetasa de ácidos grasos, isocitrato deshidrogenasa y glucosa 6 fosfato deshidrogenasa) pueden considerarse, en general, como elevados. Ello se correspondería con una lipógenesis intensa característica de la fase productiva de los terneros utilizados, como es el cebo con concentrado ad libitum. Esto justificaría que, a pesar de tratarse de animales de diferente edad, no se hayan encontrado diferencias significativas en los niveles de actividad enzimática entre los distintos lotes. Posiblemente el tejido adiposo todavía no habría completado su desarrollo en el momento del sacrificio, puesto que, como indica Pascual (2011) solo se habría producido la hipertrofia de los adipocitos en el depósito subcutáneo, y no de manera importante, mientras que en el intramuscular únicamente podría hablarse de hiperplasia, con un tamaño medio de los adipocitos muy pequeño (entre 15,915 y 22,205 μm). Por ello, sería interesante poder analizar el tejido graso de animales de más de 18 meses para comprobar si la edad no afecta a la lipogénesis en ninguna etapa de la vida del animal o si esto sólo sucede dentro del rango de edades considerado, en el que la hipertrofia ha tenido poco protagonismo. Como se expondrá más adelante, varios estudios señalan que existe una relación entre la actividad enzimática y el tamaño de los adipocitos.

Hasta cumplir los seis meses, la alimentación de los terneros se basó en leche materna, rica en grasa y con un alto contenido energético. Los animales sacrificados a esa edad mostraron una ganancia media diaria superior al resto, observándose una disminución en la GMD con el paso del tiempo. Esta disminución se debe a que a partir de cierta edad el crecimiento de los tejidos óseo y muscular va ralentizándose y no se ve compensado por el incremento de la tasa de desarrollo del tejido graso, puesto que la síntesis de grasa es un proceso energéticamente menos eficiente que la síntesis de músculo. En relación con lo anterior, cabe destacar que el espesor de grasa dorsal (EGD) de los terneros de seis meses fue inferior al presentado por el resto de animales, lo que vendría a confirmar que a esa edad el tejido adiposo todavía está lejos de alcanzar su máxima tasa de crecimiento (Pascual, 2011).

Como ya se ha indicado, la actividad de las enzimas lipogénicas en los terneros analizados ha resultado bastante elevada, y el lote de terneros de 6 meses no ha sido una excepción. Basta con comparar esos resultados con los valores obtenidos por Alzón (2003) en terneros sacrificados con 8 meses de edad para darse cuenta de los importantes niveles de actividad que presentan las enzimas lipogénicas estudiadas. Por ejemplo, la actividad de la enzima FAS en el depósito subcutáneo de los terneros analizados por Alzón (2003) alcanza los 32,9 nanomoles / (10^6 adipocitos x minuto), un

dato muy inferior a los 167 nanomoles/(10^6 adipocitos x minuto) detectados en los animales de 6 meses del presente trabajo. Por su parte, la actividad de la enzima ICDH en ese mismo depósito fue de 552,8 nanomoles / (10^6 adipocitos x minuto), muy lejos de los 2.321 nanomoles / (10^6 adipocitos x minuto) de los terneros objeto de estudio. Algo parecido ocurre en el caso de la enzima G6PDH, cuya actividad en los terneros estudiados por Alzón (2003) es 4,5 veces inferior a la detectada en este trabajo (97,4 y 439 nanomoles / (10^6 adipocitos x minuto), respectivamente). Al contrario de lo ocurrido con las tres enzimas anteriores, la actividad de la G3PDH alcanza valores parecidos en ambos ensayos (232,1 nanomoles / (10^6 adipocitos x minuto) en el estudio de Alzón (2003) y 184 nanomoles / (10^6 adipocitos x minuto) en los animales de 6 meses del lote 1). No deja de ser curioso que los niveles de actividad de las enzimas FAS, ICDH y G6PDH sean muy superiores en los terneros estudiados en el presente trabajo, mientras que la actividad de la G3PDH es muy similar en ambas experiencias. Esto puede estar relacionado con el hecho de que la actividad de la G3PDH supone prácticamente la única fuente de glicerol 3 fosfato (mientras que los ácidos grasos no sólo se obtienen gracias a la FAS) y que esta enzima no participa en otros procesos metabólicos que tienen lugar en el adipocito (como sí ocurre en el caso de la G6PDH y la ICDH). Más adelante se desarrollará esta cuestión con mayor detalle, pues también se observa algo parecido en los terneros sacrificados con 12 meses de edad, de los que se trata a continuación.

El peso medio de los terneros de 12 meses fue de 585 kg, un valor similar al obtenido por Albertí *et al.* (2001) en ejemplares de esta misma raza al año de edad. 12 meses es la edad habitual para proceder al sacrificio de los animales de raza Pirenaica, y los resultados presentados por Pascual (2011) parecen confirmarlo: a partir de esta edad el descenso de la GMD hace que no compense alargar la crianza del animal con la intención de conseguir una canal más pesada. Aún así, la fecha de sacrificio podría retrasarse en función del índice de conversión, del coste del pienso o del precio final de la canal (Pascual, 2011).

Si se compara la actividad de las enzimas FAS, ICDH y G6PDH en el depósito subcutáneo de los terneros sacrificados a los 12 meses con los valores obtenidos por Alzón (2003) y por de Eguinoa *et al.* (2003) en terneros de raza Pirenaica sacrificados a una edad similar, se comprueba que los valores observados en la presente experiencia son muy elevados. Por el contrario, los niveles de actividad detectados por Montes (2012) en terneros frisonos de unos 11 meses de edad son superiores a los obtenidos en la presente experiencia, excepto para la enzima G6PDH que muestra valores similares. En cuanto a la enzima G3PDH, resulta llamativo el hecho de que la actividad detectada en los animales sacrificados a los 12 meses presente valores parecidos a los obtenidos en los trabajos de Alzón (2003), de Eguinoa *et al.* (2003) y de Montes (2012).

Tanto la enzima isocitrato deshidrogenasa como la glucosa 6 fosfato deshidrogenasa actúan en reacciones que, aunque enmarcadas dentro del proceso de lipogénesis,

intervienen en otros procesos metabólicos: la ICDH está estrechamente relacionada con en el ciclo de Krebs (Figura 15), mientras que la G6PDH actúa en la ruta de las pentosas fosfato (Figura 13). Quiere esto decir que la actividad de estas dos enzimas no sólo está vinculada a la síntesis de lípidos, y que por lo tanto es muy difícil extraer conclusiones a partir de los datos de actividad detectados. Si se comparan con los resultados obtenidos por otros autores en terneros Pirenaicos de unos 12 meses se aprecia una gran variabilidad. Por ejemplo, la actividad de la enzima ICDH en el depósito subcutáneo de los animales del L2 es de 2.155 nanomoles / (10^6 adipocitos x minuto), mientras que en el caso de Alzón (2003) se queda en 1.085,8 nanomoles / (10^6 adipocitos x minuto) y en el estudio de Eguinoa *et al.* (2003) únicamente alcanza 220 nanomoles / (10^6 adipocitos x minuto). Algo parecido ocurre con la G6PDH, enzima cuyos niveles de actividad oscilan entre los 468 nanomoles / (10^6 adipocitos x minuto) en el depósito subcutáneo de los terneros del lote L2 y los 122,1 nanomoles / (10^6 adipocitos x minuto) medidos por Alzón (2003) en ese mismo depósito.

En cuanto a las otras dos enzimas estudiadas, la glicerol 3 fosfato deshidrogenasa y la sintetasa de ácidos grasos, es importante destacar que, a diferencia de las anteriores, únicamente actúan en reacciones pertenecientes a la lipogénesis. La G3PDH es la responsable de la síntesis de glicerol-3-fosfato (Figura 14), mientras que la FAS interviene en la generación del ácido palmítico (Figura 15) al partir del cual se producirán otros ácidos grasos tal y como se ha explicado en el apartado dedicado a la lipogénesis. Los valores de actividad de la enzima FAS, comparados con los obtenidos por los autores citados anteriormente, son superiores, existiendo una gran variabilidad entre ellos. Estas diferencias pueden estar causadas por la alimentación que se ha proporcionado a los animales, pues hay que recordar que los ácidos grasos que se depositan en los diferentes depósitos adiposos no sólo son los producidos mediante la conocida como “síntesis *de novo*” (que es donde interviene la FAS) sino también aquellos que se incorporan de los vasos sanguíneos por mediación de la enzima lipoprotein lipasa (LPL). Dependiendo de la alimentación del ternero, variarán los niveles de glucosa y acetato y también la concentración de ácidos grasos circulantes, lo que hará que la actividad de la enzima FAS se vea afectada. Precisamente, el que la actividad de la sintetasa de ácidos grasos sea más baja que la del resto de enzimas tanto en esta experiencia como en los estudios de Alzón (2003), Eguinoa *et al.* (2003) y Montes (2012) parece estar relacionado con la existencia de una elevada concentración de ácidos grasos circulantes, que disminuye la necesidad de síntesis *de novo*.

Merece la pena detenerse en los resultados de la enzima G3PDH. La actividad de esta enzima en los animales del lote de terneros de 12 meses ha sido de 226 nanomoles / (10^6 adipocitos x minuto), un valor muy similar a los detectados por Alzón (2003) y Eguinoa *et al.* (2003) en terneros pirenaicos de unos 12 meses (289,9 y 253 nanomoles / (10^6 adipocitos x minuto), respectivamente). La actividad de la enzima G3PDH en el

estudio llevado a cabo por Montes (2012) con terneros Holstein de 11 meses también fue parecida (290 nanomoles / (10⁶ adipocitos x minuto), aún cuando el resto de enzimas mostraron una actividad muy superior a las registrada en el presente trabajo y en los estudios de Alzón (2003) y Eguinoa *et al.* (2003).

La glicerol 3 fosfato deshidrogenasa es la enzima responsable de la síntesis de glicerol 3 fosfato. Esta molécula, aunque puede generarse por otras vías, procede fundamentalmente de un derivado de la glucosa, la dihidroxiacetona fosfato, que evoluciona hasta glicerol 3 fosfato mediante una reacción catalizada por la enzima G3PDH. Que la inmensa mayoría del glicerol 3 fosfato dependa de una reacción catalizada por esta enzima significa que puede considerarse la actividad de la misma como un indicador de la síntesis total de triglicéridos que se lleva a cabo en el interior de los adipocitos (Díaz, 2010).

El hecho de que los datos de actividad de la enzima G3PDH detectados en este estudio, así como en los anteriormente citados de Alzón (2003) y Eguinoa *et al.* (2003) y también en la experiencia llevada a cabo por Montes (2012) sean bastante similares induce a pensar que la actividad de esta enzima no se ve tan afectada como la del resto de enzimas lipogénicas por otros procesos metabólicos (en el caso de la ICDH y la G6PDH) o la dieta (como le ocurre a la FAS).

En relación con los animales de los lotes 3 y 4, de 18 meses de edad, es preciso recordar que no es frecuente retrasar tanto tiempo el sacrificio de los terneros esta raza. Como ya se ha señalado anteriormente, la edad de sacrificio habitual en la raza Pirenaica es de 12 meses, no resultando rentable alargar el cebo mucho más allá. Los ejemplares estudiados mostraron un notable incremento del espesor de la grasa dorsal respecto a los animales de 6 meses (Pascual, 2011). Por su parte, la actividad de las enzimas lipogénicas no mostró diferencias significativas en relación con los terneros de 6 y 12 meses, mostrando igualmente valores elevados.

En cuanto a la diferente concentración energética de la ración proporcionada a los ejemplares sacrificados con 18 meses de edad, es preciso señalar que no ha influido sobre el tamaño de los adipocitos, ya que no se aprecian diferencias significativas entre los lotes 3 y 4. Este hecho ya había sido observado por Sayed *et al.* (2007), también en terneros de raza Pirenaica. El contenido energético tampoco ha afectado de manera significativa a los niveles de actividad de las enzimas G3PDH, FAS, ICDH y G6PDH. Es posible que los resultados hubieran sido otros si se hubiese controlado la cantidad de pienso ingerido por los terneros en vez de proporcionárselo *ad libitum*. Que el acceso al pienso haya sido a voluntad ha permitido a los animales cuya ración era menos energética (L4) tomar una mayor cantidad de alimento, compensando en parte la diferencia de casi 300 kcal EM/kg respecto del pienso consumido por los integrantes del lote L3. Esto ha podido reducir las diferencias que cabía esperar entre los ejemplares sacrificados a los 18 meses, tanto en lo que se refiere a la actividad

enzimática como a las características productivas o el tamaño y número de los adipocitos (Pascual, 2011).

En resumen, puede afirmarse que los niveles de actividad de las enzimas objeto de estudio (glicerol 3 fosfato deshidrogenasa, isocitrato deshidrogenasa, glucosa 6 fosfato deshidrogenasa y sintetasa de ácidos grasos) han resultado bastante altos y que ni la edad de los terneros ni el nivel de energía de la ración han tenido influencia sobre los mismos.

Además del efecto lote (edad) y del efecto concentración energética de la dieta también se han estudiado las posibles diferencias que pudieran existir en la actividad enzimática entre los depósitos subcutáneo e intramuscular. Contrariamente a lo ocurrido en los factores anteriores, parece que el tipo de depósito sí influye sobre la actividad de las enzimas estudiadas, observándose una mayor actividad en el depósito subcutáneo que en el intramuscular. Los resultados obtenidos por Montes (2012) en su estudio sobre la inclusión de fuentes de ácidos grasos poliinsaturados en la alimentación de terneros de raza Holstein reflejan una situación similar, detectando así mismo una mayor actividad enzimática en el depósito subcutáneo.

Se han constatado mayores niveles de actividad enzimática en el depósito subcutáneo con respecto al intramuscular en todos los lotes y para cada una de las enzimas estudiadas. En relación con estos resultados, hay que señalar que a pesar de haberse repetido la medición en varias ocasiones, no se consiguió detectar actividad de la enzima glucosa 6 fosfato deshidrogenasa (G6PDH) en el depósito intramuscular, lo que parece confirmar la reducida actividad enzimática en este depósito.

Pascual (2011) indica que en el depósito subcutáneo se observa una distribución bimodal de los adipocitos, existiendo dos poblaciones claramente diferenciadas en función de su tamaño: una estaría integrada por adipocitos “pequeños” y otra por adipocitos “grandes”. Los primeros serían aquellos cuyo diámetro oscilara entre las 10 y las 80 micras (lo que supone en torno al 46 % del total de células adiposas observadas) mientras que los segundos tendrían un diámetro comprendido entre las 80 y las 310 micras (el 54 % de los adipocitos). Según el mismo autor, el hecho de que los adipocitos presenten esta distribución de frecuencias en la que coexisten dos comunidades de células (una integrada por aquellas que presentan un diámetro inferior a las 80 micras y una segunda con adipocitos de diámetro superior a esa cifra) puede estar indicando el que se estén produciendo tanto procesos de hiperplasia como de hipertrofia de manera simultánea. Es decir, que al mismo tiempo que se está produciendo una proliferación de células adiposas, también esté ocurriendo un aumento del tamaño de los adipocitos. Pascual (2011) hace referencia a que en el estudio llevado a cabo por Sayed *et al.* (2007) con terneros de raza Pirenaica también se apreciaba este fenómeno, al igual que en el trabajo de Schoonmaker *et al.* (2004) sobre terneros de raza Holstein.

Por el contrario, en el depósito intramuscular no se aprecian signos de distribución bimodal de los adipocitos en función de su diámetro ni en los lotes ni, por lo general, al observar uno por uno los resultados para cada ternero. Más bien, se observan distribuciones con asimetría negativa desplazadas hacia la izquierda, en las que predominan los adipocitos de pequeño tamaño. Mientras que en el depósito subcutáneo el 75 % de las células adiposas observadas tenía un diámetro superior a las 30 micras, en el depósito intramuscular el diámetro de la mayoría de los adipocitos no alcanza esa magnitud (Pascual, 2011). Este mismo autor señala que las diferencias de tamaño existentes entre ambos depósitos también han sido observadas en otros trabajos como los desarrollados por Mendizábal *et al.* (1999), Alzón *et al.* (2007) y Sayed *et al.* (2007). Quizá tenga que ver con esto el hecho de que el depósito subcutáneo, como ya se ha explicado en su momento, se desarrolle antes que el intramuscular (figura 7). Estos resultados llevan a Pascual (2011) a afirmar que no se observan procesos de hipertrofia en los adipocitos del depósito intramuscular durante el periodo comprendido entre los 6 y los 18 meses, y que el desarrollo de este depósito se produce fundamentalmente por hiperplasia.

Es posible que los diferentes valores de actividad enzimática lipogénica encontrados en ambos depósitos se deban en parte al diferente tamaño de los adipocitos. Arana *et al.* (1998), en su estudio sobre el tejido adiposo de corderos de raza Rasa Aragonesa, observaron un aumento en la actividad de las enzimas G3PDH y FAS en el momento de máxima hipertrofia de los adipocitos, tanto en el depósito subcutáneo como en el perirrenal. En el ya citado trabajo de Montes (2012) sobre terneros Holstein, se señala que los adipocitos del depósito subcutáneo eran mayores y presentaban una actividad enzimática más elevada que los adipocitos del depósito intramuscular. Eguinoa *et al.* (2003) afirman que, aunque parece probable que los adipocitos que incrementan su tamaño lo hacen como consecuencia de una alta actividad enzimática, tampoco es descartable que, al menos en alguna de las enzimas, la razón del aumento de su actividad se deba al mayor tamaño de la célula y no al revés.

Parece pues que existe una relación entre el tamaño de las células adiposas y la actividad de las enzimas implicadas en la lipogénesis, aunque este es un tema que todavía no es bien conocido y que puede verse afectado por otros factores como el sexo, la raza o el depósito, independientemente del tamaño de los adipocitos (Eguinoa *et al.*, 2003).

En definitiva, la actividad de las enzimas lipogénicas estudiadas (glicerol 3 fosfato deshidrogenasa, sintetasa de ácidos grasos, isocitrato deshidrogenasa y glucosa 6 fosfato deshidrogenasa) no se ha visto influida ni por la edad ni por la concentración energética de la dieta. Sobre este último aspecto ha podido afectar el que el alimento se suministrara ad libitum, permitiendo a los terneros a los que se había asignado un pienso con menor concentración energética compensar esa diferencia mediante un incremento en el consumo. En relación con la edad, cabe preguntarse qué hubiera

ocurrido en el caso de haber podido contar con animales de más de 18 meses (y por lo tanto, con un mayor desarrollo graso), ya que entre los 6 y los 18 meses la hipertrofia adipocitaria fue poco importante.

CONCLUSIONES

7. CONCLUSIONES

Una vez analizados los valores de actividad de las enzimas lipogénicas objeto de estudio (glicerol 3 fosfato deshidrogenasa, sintetasa de ácidos grasos, isocitrato deshidrogenasa y glucosa 6 fosfato deshidrogenasa) pueden extraerse las siguientes conclusiones:

1. La actividad de las enzimas lipogénicas estudiadas no ha mostrado diferencias significativas entre los lotes de terneros. Aunque los animales eran de diferente edad, el hecho de que en los tres momentos de sacrificio elegidos (6, 12 y 18 meses) los terneros pudieran encontrarse en un periodo de intensa lipogénesis podría explicar esta ausencia de diferencias en la actividad enzimática.
2. La composición de la ración tampoco ha tenido influencia sobre la actividad de las enzimas lipogénicas, no observándose diferencias significativas entre los terneros alimentados con un pienso rico en energía y los que recibieron una ración con menor concentración energética. El que el pienso fuera suministrado ad libitum podría haber permitido a estos últimos compensar en parte esta diferencia energética mediante el incremento en el consumo, lo que seguramente ha afectado al resultado final. Por ello, sería recomendable establecer una diferencia superior al 10 % en la concentración energética para estudiar este efecto.
3. Sí se han observado diferencias entre los depósitos grasos considerados, detectándose una mayor actividad enzimática en el depósito subcutáneo que en el intramuscular. Esto podría estar relacionado con el diferente desarrollo de estos depósitos grasos, de manera que el depósito SC, que también presentó un mayor tamaño de los adipocitos, tendría un desarrollo más precoz que el intramuscular.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ACERO, P. Fisiología del crecimiento. En: BUXADÉ, C. *Estructura, etnología, anatomía y fisiología*. Madrid: Ediciones Mundi-Prensa, 1994. Zootecnia-Bases de producción animal, tomo I. Colección coordinada y dirigida por Carlos Buxadé Carbó. ISBN 84-7114-535-9.
- ALBERTÍ, P., LAHOZ, F., TENA, R., JAIME, S., SAÑUDO, C., OLLETA, J. L., CAMPO, M. M., PANEA, B., PARDOS, J.J. Producción y rendimiento carnicero de siete razas bovinas españolas faenadas a distintos pesos. *Informaciones Técnicas*, 2001, nº 101. ISSN 1137-1730.
- ÁLVAREZ, A., PÉREZ, H., MARTÍN, T., QUINCOSA, J., SÁNCHEZ, A. *Fisiología animal aplicada*. Colombia: Editorial Universidad de Antioquía, 2009. Colección Ciencia y Tecnología. ISBN 978-958-714-219-8.
- ÁLVAREZ, J. L. *Bioquímica nutricional y metabólica del bovino en el trópico*. Colombia: Editorial Universidad de Antioquía, 2001. ISBN 978-958-655-508-1.
- ALZÓN, M. *Desarrollo y metabolismo del tejido graso de terneros de siete razas autóctonas españolas de aptitud cárnica*. Arana Navarro, Ana y Mendizábal Aizpuru, José Antonio (Dir.) Tesis doctoral. Universidad Pública de Navarra. Escuela Técnica Superior de Ingenieros Agrónomos, mayo 2003.
- ARANA, A., SORET, B., MENDIZÁBAL, J. A., CORROZA, M., EGUINOVA, P. PURROY, A. Changes in adipose tissue accumulation in Rasa Aragonesa breed lambs during growth and fattening. *Animal Science*, 1998, vol. 66, nº 2, pp. 409-413. ISSN 1357-7298.
- ARANGUREN, F. J. *La raza Pirenaica*. España: editado por la Asociación de Criadores de Vacuno Pirenaico de Navarra (ASPINA) y el Instituto Técnico y de Gestión Ganadero (ITG Ganadero), 2002.
- BECERRIL, S. *Obtención de un ratón doble knockout de los genes que codifican la isoforma inducible de la sintasa de óxido nítrico y la leptina. Estudio de las consecuencias biológicas derivadas de la ausencia de ambos genes*. Frühbeck Martínez, Gema y Gómez Ambrosi, Javier (Dir.). Tesis doctoral. Universidad de Navarra. Facultad de Ciencias, marzo 2011. ISBN 84-8081-095-5.
- BUENO, G., MOJICA, J. E., TAPIERO, A., PARDO, O. *Alimentación bovina con base en cultivos forrajeros en fincas de pequeños productores del Piedemonte del Meta*. Colombia: Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria (CORPOICA), 2004. ISBN 978-958-97463-5-6.

- CARAVACA, F. P., CASTEL, J. M., GUZMÁN, J. L., DELGADO, M., MENA, Y., ALCALDE, M. J., GONZÁLEZ, P. *Bases de la producción animal*. Sevilla: Secretariado de Publicaciones de la Universidad de Sevilla, 2003. Manuales Universitarios, nº 61. ISBN 84-472-0764-1.
- CINTI, S. The adipose organ. En: FANTUZZI, G., MAZZONE, T. *Adipose Tissue and Adipokines in Health and Disease*. EEUU: Editorial Humana Press Inc., 2007, pp. 3-19. ISBN 978-1-59745-370-7.
- CONFEDERACIÓN DE ASOCIACIONES DE GANADO VACUNO PIRENAICO (CONASPI). *Informe y Memoria de CONASPI - Año 2012*. Acceso: 2 de junio de 2013.
<http://www.conaspi.es/vercontenido.asp?conid=13498&menid=1540&web=22>
- DALMAU, A. *Comportamiento social y de alimentación del rebeco pirenaico (Rupicapra pyrenaica pyrenaica)*. Ferret Quesada, Alfred y Manteca Vilanova, Xavier (dir.). Tesis doctoral. Universitat Autònoma de Barcelona. Departament de Ciència Animal i dels Aliments, 2005.
- DE BLAS, C. Cambios en el perfil de ácidos grasos en productos animales en relación con la alimentación animal y humana. Importancia del ácido linoleico conjugado. 1. Rumiantes. En: *XX Curso de Especialización FEDNA. Avances en Nutrición y Alimentación Animal (Barcelona, 22 y 23 de noviembre de 2004)*, pp. 79-100.
- DEVLIN, T. M. *Bioquímica. Libro de texto con aplicaciones clínicas*. Traducido por Francesc Canals, Claudi M. Cuchillo, Sònia Segura y Pere Suau. Revisado por Claudi M. Cuchillo. 4ª edición (correspondiente a la 5ª edición original), España: Editorial Reverté, 2004. ISBN 84-291-7208-4.
- DÍAZ, J. *Efecto de la utilización de lino en la alimentación de corderos de cebo sobre el desarrollo y metabolismo del tejido graso*. Medizábal Aizpuru, José Antonio (Dir.). Trabajo Fin de Carrera. Universidad Pública de Navarra. Escuela Técnica Superior de Ingenieros Agrónomos, junio 2010.
- DIJKSTRA, J., FORBES, J. M., FRANCE, J. Introduction. En: DIJKSTRA, J., FORBES, J. M., FRANCE, J. *Quantitative aspects of ruminant digestion and metabolism*. 2ª ed., Reino Unido: CABI Publishing, 2005, pp. 1-10. ISBN 0-85199-8143.
- ECHEVERRÍA, T., ASARTA, A. El ganado vacuno de raza Pirenaica. *Pastos (Revista de la Sociedad Española para el Estudio de los Pastos)*, 1976, vol. 6, nº 2, pp. 213-234. ISSN 0210-1270.
- EGUINO, P., BROCKLEHURST, A., ARANA, A., MENDIZÁBAL, J. A., VERNON, R. G., PURROY, A. Lipogenic enzyme activities in different adipose depots of

- Pirenaican and Holstein bulls and heifers taking into account adipocyte size. *Journal of Animal Science*, febrero, 2003, vol. 81, nº 2, pp. 432-440. ISSN 0021-8812.
- FAWCETT, D. W. *Tratado de histología*. 12ª ed., Méjico: Editorial Mc Graw Hill Interamericana, 1995. ISBN 9682524504.
 - FORNAGUERA, J., GÓMEZ, G. *Bioquímica: la ciencia de la vida*. Costa Rica: Editorial Universidad Estatal a Distancia (EUNED), 2004. ISBN 978-9968-31-326-1.
 - GARRIDO, A., TEIJÓN, J. *Fundamentos de bioquímica metabólica*. 2ª ed., España: Editorial Tébar, 2006. ISBN 978-84-7360-229-7.
 - GIL, A. *Bases Fisiológicas y Bioquímicas de la Nutrición*. 2ª ed., España: 2010. Tratado de nutrición coordinado por F. Sánchez de Medina, tomo I. ISBN 978-84-9835-346-4.
 - GLOOBE, H. *Anatomía aplicada del bovino*. Costa Rica: Servicio Editorial IICA, 1989. Libros y Materiales Educativos, nº 91. ISBN 929039160-X.
 - GONZÁLEZ, A., VARELA, A., SHIMADA, A., MORA, O. Diferenciación in vitro de preadipocitos de tejido adiposo bovino. *Técnica pecuaria en México*, 2008, vol. 46, nº 2, pp. 195-204. ISSN 0040-1889.
 - HILL, R. W. *Fisiología animal comparada*. Traducido por Jesús Palomeque. España: Editorial Reverté, 1980. ISBN 978-84-291-1829-2.
 - HOCQUETTE, J.F., GONDRET, F., BAÉZA, E., MÉDALE, F., JURIE, C., PETHICK, D.W. Intramuscular fat content in meat-producing animals: development, genetic and nutritional control, and identification of putative markers. *Animal*, 2010, vol. 4, nº 2, pp. 303-319, ISSN: 1751-7311.
 - HUTJENS, M. *Guía de alimentación*. Traducido por Abelardo Martínez. 2ª ed. EEUU: Editorial Hoard's Dairyman, 2003. ISBN 0-932147-41-0.
 - IUPAC (International Union of Pure and Applied Chemistry). *Compendium of Chemical Terminology - Gold Book. Versión 2.3.2*. ISBN 0-9678550-9-8. Acceso: 2 de junio de 2013. <http://goldbook.iupac.org/PDF/goldbook.pdf>
 - KÖNIG, H.E., SAUTET, J., LIEBICH, H.-G. Aparato digestivo (Apparatus digestorius). En: KÖNIG, H.E., LIEBICH, H.-G. *Anatomía de los Animales Domésticos. Órganos, sistema circulatorio y sistema nervioso*. Traducido por Jorge E. B. Ostrowski y Lorenzo A. Facorro; revisado por J. Ruberte, A. Carretero

- y M. Navarro. 2ª ed., Madrid: Editorial Médica Panamericana, 2005, pp. 15-80. ISBN 978-84-7903-747-5.
- KUHNEL, W. *Atlas de poche d'histologie*. 2ª ed., Francia: Médecine-Sciences Flammarion, 1997. ISBN 9782257000163.
 - MARTÍN, V. J. Consumo de carne de vacuno en España. *Distribución y Consumo*, marzo-abril, 2011, nº116, pp. 95-98. ISSN 1132-0176.
 - MARTÍNEZ, A. L., PÉREZ, M., PÉREZ, L., GÓMEZ, G. Digestión de los lípidos en los rumiantes: una revisión. *Interciencia*, abril 2010a, vol. 35, nº 4, pp. 240-246. ISSN 0378-1844.
 - MARTINEZ, A. L., PÉREZ, M., PÉREZ, L., GÓMEZ, G., CARRIÓN, D. Metabolismo de los lípidos en los rumiantes. *REDVET. Revista Electrónica de Veterinaria*, agosto, 2010b, vol. 11, nº 8. ISSN 1695-7504.
 - MELO, V., CUAMATZI, O. *Bioquímica de los Procesos Metabólicos*. 2ª ed., México: Reverté Ediciones, 2007. ISBN 968-6708-61-8.
 - MENDIZÁBAL, J. A., IBARBIA, J. R., ETXANIZ, J. M. Aportaciones a la historia de la raza vacuna Pirenaica. Paradigma de la zootecnia española. *Archivos de Zootecnia*, 2005, vol. 54, nº 205, pp. 39-50. ISSN 0004 – 0592.
 - MENDIZÁBAL, J. A., PURROY, A., ARANGUREN, F. J., EGUINO, P., ARANA, A. Evolución de la morfología en la raza vacuna Pirenaica. *Archivos de Zootecnia*, 1998, vol. 47, nº 178 - 179, pp. 387-395. ISSN 0004 – 0592.
 - MINISTERIO DE AGRICULTURA, ALIMENTACIÓN Y MEDIO AMBIENTE. DIRECCIÓN GENERAL DE PRODUCCIONES Y MERCADOS AGRARIOS. SUBDIRECCIÓN GENERAL DE PRODUCTOS GANADEROS. *Caracterización del sector vacuno de carne en España. Año 2012*. Acceso: 2 de junio de 2013.
http://www.magrama.gob.es/app/vocwai/documentos/Adjuntos_AreaPublica/CARACTERIZACI%C3%93N%20DEL%20SECTOR%20VACUNO%20DE%20CARNE%20EN%20ESPA%C3%91A%202012.pdf
 - MINISTERIO DE AGRICULTURA, ALIMENTACIÓN Y MEDIO AMBIENTE. *Indicación Geográfica Protegida "Ternera de Navarra; Nafarroako Aratxea"*. Acceso: 24 de mayo de 2013.
http://www.magrama.gob.es/es/alimentacion/temas/calidad-agroalimentaria/calidad-diferenciada/dop/carnes/DOP_Ternera_Navarra.aspx
 - MONTES, J. *Metabolismo del tejido graso de terneros alimentados con fuentes ricas en ácidos grasos poliinsaturados*. Gómez Bastida, Inmaculada y Medizábal Aizpuru, José Antonio (Dirs.). Trabajo Fin de Carrera. Universidad Pública de Navarra. Escuela Técnica Superior de Ingenieros Agrónomos, octubre 2012.

- MORA, I. *Nutrición animal*. Costa Rica: Editorial Universidad Estatal a Distancia (EUNED), 1991. ISBN 9977-64-557-4.
- MORENO ESTEBAN, B., MONEREO MEGÍAS, S., ÁLVAREZ HERNÁNDEZ, J. *Obesidad: la epidemia del siglo XXI*. 2ª ed., España: Ediciones Díaz de Santos, 2000. ISBN 84-7978-430-X.
- MORENO, M. J., MARTÍNEZ, J. A. El tejido adiposo: órgano de almacenamiento y órgano secretor. *Anales del Sistema Sanitario de Navarra*, 2002, vol. 25, nº 1, pp. 29-39. ISSN 1137-6627.
- MURIANA, F. J. G. Metabolismo de los ácidos grasos. En: MATAIX, J. y GIL, A. *Libro blanco de los Omega-3. Los ácidos grasos poliinsaturados Omega 3 y monoinsaturados tipo oleico y su papel en la salud*. España: Editorial Médica Panamericana, 2004. ISBN 84-7903-936-1.
- OBREGÓN, M. J. Obesidad, termogénesis y hormonas tiroideas. *Revista Española de Obesidad*, 2007, vol 5, nº 1, pp. 27-38. ISSN 16966112.
- OSORIO, J. H., VINAZCO, J. El metabolismo lipídico bovino y su relación con la dieta, condición corporal, estado productivo y patologías asociadas. *Biosalud*, julio – diciembre 2010, vol. 9, nº 2, pp. 56-66. ISSN 1657-9550.
- PABÓN, M. L. *Bioquímica ruminal*. Colombia: Unibiblos, 2004. Colección Notas de clase. ISBN 958-701-464-2.
- PABÓN, M. L. *Notas de clase. Bioquímica ruminal*. Colombia: Universidad Nacional de Colombia, 2004. ISBN 958-701-464-2.
- PACHECO, D. *Bioquímica médica*. Méjico: Editorial Limusa, 2004. ISBN 968-18-6468-9.
- PALMQUIST, D. L. Utilización de lípidos en dietas de rumiantes. En: *XII Curso de especialización FEDNA Avances en Nutrición y Alimentación Animal* (Madrid, 7 y 8 de noviembre de 1996), pp. 39-57.
- PASCUAL, A. *Desarrollo del tejido graso subcutáneo e intramuscular durante el crecimiento y cebo de terneros de raza pirenaica*. Soret Lafraya, Beatriz y Medizábal Aizpuru, José Antonio (Dirs.). Trabajo Fin de Carrera. Universidad Pública de Navarra. Escuela Técnica Superior de Ingenieros Agrónomos, septiembre 2011.
- PEÑA, A., ARROYO, A., GÓMEZ, A., TAPIA, R., GÓMEZ, C. *Bioquímica*. 2ª ed., México: Editorial Limusa, 2004. ISBN 968-18-2660-4.

- PÉREZ, B. *Suplementación de raciones para cebo intensivo de terneros con aceites vegetales: rendimientos productivos, calidad de la canal, de la grasa y de la carne*. Castro Madrigal, Teresa y Jimeno Vinatea, Vicente (Dir.). Tesis doctoral. Universidad Complutense de Madrid. Facultad de Veterinaria, 2010. ISBN 978-84-694-2812-2.
- QUESADA, V., ISIDORO, A., LÓPEZ, L. A. *Curso y ejercicios de estadística*. 2ª ed., España: Editorial Alhambra, 2002. ISBN 84-205-0878-0.
- ROBELIN, J., CASTIELLA, L. Différenciation, croissance et développement du tissu adipeux. *Inra Productions Animales*, 1990, vol. 3, nº 4, pp. 243-252. ISSN 0990-0632.
- RODRÍGUEZ, V.M., SIMÓN E. *Bases de la alimentación humana*. España: editorial Netbiblo, 2008. ISBN 978-84-9745-215-1.
- ROSS, M. H., PAWLINA, W. *Histología: texto y atlas color con biología celular y molecular*. Traducido por Jorge Negrete. 5ª ed., Argentina: Editorial Médica Panamericana, 2008. ISBN 978-950-06-0435-2.
- SAINZ, R. D., HASTING, E. Simulation of the Development of Adipose Tissue in Beef Cattle. En: McNAMARA, J. P., FRANCE, J. y BEEVER, D. *Modelling Nutrient Utilization in Farm Animals*. Reino Unido: CABI Publishing, 2000. ISBN 0 85199 449 0.
- SAYED, S., ABADÍA, S., MENDIZÁBAL, J. A., ARANA, A., SORET, B., ALBERTÍ, P., PURROY, A. Efecto de la alimentación con dietas ricas en ácidos grasos poliinsaturados sobre el desarrollo del tejido graso de terneros. *ITEA. Producción animal*, mayo, 2007, volumen extra nº 28 (2), pp. 768-770. ISSN 1130-6009.
- SCHOONMAKER, J. P., FLUHARTY, F. L., LOERCH, S. C. Effect of source and amount of energy and rate of growth in the growing phase on adipocyte cellularity and lipogenic enzyme activity in the intramuscular and subcutaneous fat depots of Holstein steers. *Journal of Animal Science*, enero, 2004, vol 82, nº 1, pp. 137-148. ISSN 0021-8812.
- SILLA, M. H. *Dieta mediterránea y alimentos funcionales. Seguridad alimentaria*. España: Editorial de la UPV, 2004. ISBN 84-9705-684-1.
- SITNA (Sistema de Información Territorial de Navarra). *Mapa de Navarra (catastro, 2013)*. Acceso: 24 de mayo de 2013.
<http://sitna.navarra.es/navegar/>
- SIZER, F. S., WHITNEY, E, PICHÉ, L. A. *Nutrition. Concepts and Controversies*. 2ª ed., Canadá: Editorial Nelson Education Ltd., 2012. ISBN-10: 0176502580.

- SKOOG, D. A., HOLLER, F. J., CROUCH, S. R. *Principios de análisis instrumental*. 6ª ed., México: Editorial Cengage Learning, 2008. ISBN 970-686-829-1.
- SORET, B., MENDIZÁBAL, J.A., ARANA, A., PURROY, A., EGUINO, P. breed effects on cellularity and lipogenic enzymes in growing Spanish lambs. *Small Ruminant Research*, 1998, vol. 29, nº 1, pp. 103-112. ISSN 0921-4488.
- TOKACH, R. J., CHUNG, K. Y., JOHNSON, B. J. Factors affecting intramuscular adipose tissue development in beef cattle. Presentado en: Certified Angus Beef Association, 2010.
- UREÑA, F. *Digestión, absorción y metabolismo de los lípidos en monogástricos y rumiantes*. Universidad de Córdoba. Acceso: 23 de abril de 2013.
<www.uco.es/zootecniaygestion/menu.php?tema=154>
- URRUTIA, O. *Efecto de la dieta en el nivel de expresión génica de las enzimas Acetil-CoA Carboxilasa, Lipoprotein Lipasa y Esteroil-CoA Desaturasa, enzimas lipogénicas implicadas en la síntesis y acumulación de ácidos grasos insaturados en el depósito subcutáneo de ovino*. Arana Navarro, Ana (Dir.). Trabajo Fin de Carrera. Universidad Pública de Navarra. Escuela Técnica Superior de Ingenieros Agrónomos, septiembre 2010.
- VALENZUELA, A. Fisiología del tejido adiposo. En: ALBALA, C., KAIN, J., BURROWS, R., DÍAZ, E. *Obesidad: un desafío pendiente*. Chile: Editorial Universitaria S.A., 2000, pp. 61-68. ISBN 956-11-1552-2.
- VALENZUELA, A., SANHUEZA, J. El tejido adiposo: algo más que un reservorio de energía. *Grasas y aceites*, 2009, vol. 60, nº 5, pp. 437-450. ISSN 0017-3495.
- VAN LIER, E., REGUEIRO, M. *Digestión en retículo-rumen*. Uruguay: Universidad de la República. Facultad de Agronomía - Departamento de Producción Animal y Pasturas, 2008. Curso de anatomía y fisiología animal. Acceso: 13 de abril de 2013.
<prodanimal.fagro.edu.uy/cursos/AFA/TEORICOS/Repartido-Digestion-en-Reticulo-Rumen.pdf>
- VELASCO, S. *Caracterización de los depósitos adiposos de corderos lechales en función de diversos parámetros productivos*. Cañeque Martínez, Vicente y Lauzurica Gómez, Sara (Dirs.). Tesis doctoral. Universidad Complutense de Madrid. Facultad de Veterinaria, diciembre 1998.
- VERNON, R. G. Lipid Metabolism in adipose tissue of ruminant animals. *Progress in Lipid Research*, 1980, vol 19, ISSS 1-2, pp. 23-106. ISSN 0163-7827.
- VOET, D., VOET, J. G. *Bioquímica*. Traducido por Pablo Baldi, Laura Patricia Blumetti, Silvia Fernández Castelo, Octavio Giovanniello, Diana Klajn, Karen

Mikkelsen, Daniel Pirola, María Victoria Preciado y Silvia Rondinone. 3ª ed., Argentina: Editorial Médica Panamericana, 2006. ISBN 950-06-2301-3.

- WATTIAUX, M. A., ARMENTANO, L. E. *Metabolismo de carbohidratos en vacas lecheras*. EEUU: Universidad de Wisconsin-Madison, Instituto Babcock para la Investigación y Desarrollo Internacional de la Industria Lechera. Colección Esencias Lecheras. Acceso: 13 de abril de 2013.
http://babcock.wisc.edu/sites/default/files/de/es/de_03.es.pdf
- WATTIAUX, M. A., GRUMMER, R. R. *Metabolismo de lípidos en las vacas lecheras*. EEUU: Universidad de Wisconsin-Madison, Instituto Babcock para la Investigación y Desarrollo Internacional de la Industria Lechera. Colección Esencias Lecheras. Acceso: 24 de abril de 2013.
http://babcock.wisc.edu/sites/default/files/de/es/de_04.es.pdf

